

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS

Departamento de Física Atómica, Molecular y Nuclear



TESIS DOCTORAL

Cálculo del coeficiente de difusión y medidas in-vivo con HP^3He y ^{19}F mediante imagen de resonancia magnética: comparación entre tejido pulmonar sano y enfisematoso

Calculation and in-vivo measurements of diffusion coefficient with HP^3He and ^{19}F gases MRI : comparison between healthy and emphysematous lung tissue

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Carrero González

Directores

**Detlef Stiller
Ignacio Rodríguez**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA ATÓMICA, MOLECULAR Y NUCLEAR



**CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DIFUSION Y MEDIDAS IN-VIVO CON
HP³He Y ¹⁹F MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA:
COMPARACIÓN ENTRE TEJIDO PULMONAR SANO Y ENFISEMATOSO**

**CALCULATION AND IN-VIVO MEASUREMENTS OF DIFFUSION
COEFFICIENT WITH HP³He AND ¹⁹F GASES MRI: COMPARISON
BETWEEN HEALTHY AND EMPHYSEMATOUS LUNG TISSUE**

TESIS DOCTORAL

LAURA CARRERO GONZÁLEZ

Madrid, 2013

**CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DIFUSION Y MEDIDAS IN-VIVO CON
HP³He Y ¹⁹F MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA:
COMPARACIÓN ENTRE TEJIDO PULMONAR SANO Y ENFISEMATOSO**

**CALCULATION AND IN-VIVO MEASUREMENTS OF DIFFUSION
COEFFICIENT WITH HP³He AND ¹⁹F GASES MRI: COMPARISON
BETWEEN HEALTHY AND EMPHYSEMATOUS LUNG TISSUE**

Directores:

Dr. Detlef Stiller

Dr. Ignacio Rodríguez

LAURA CARRERO GONZÁLEZ

Madrid, 2013

Acknowledgements/ Agradecimientos/ Dankbarkeiten

I wish to express my sincerest gratitude to all those people who have contributed to make this thesis become reality. First of all, I would like to mention my supervisors, Dr. Detlef Stiller and Dr. Ignacio Rodríguez for their knowledge, mentoring and guidance during these last years. I also want to express my gratitude to Dr. Jesús Ruiz-Cabello, who led me and my career at the beginning of this work.

I want to thank my colleagues from the lab at Boehringer Ingelheim in Biberach: Dr. Thomas Kaulisch, Dr. Heiko Niessen, Dr. Selina Bucher, Michael Neumaier, Julia Tillmanns and David Kind for their help in the daily work life and the pleasant atmosphere. Ich möchte auch meinen Kollegen aus dem Labor von BI in Biberach danken: Dr. Thomas Kaulisch, Dr. Heiko Niessen, Dr. Selina Bucher, Michael Neumaier, Julia Tillmanns und David Kind für ihre Hilfe in täglichen Arbeitsleben und dem angenehmen Arbeitsklima.

In particular, I would like to express my deepest gratefulness to Dr. Thomas Kaulisch for everything related to my thesis and my career since the beginning of my stay in Biberach; his continuous help, constant support, fruitful critique, tireless discussions and above all his infinite patience and encouragement. Meine aufrichtige Dankbarkeit gehört Dr. Thomas Kaulisch für seine andauernde Hilfe, stetige Unterstützung, konstruktive Kritik, unermüdlichen Diskussionen und vor allem für seine ständige Geduld und Ermutigung seit Beginn meines Aufenthalts in Biberach.

I owe many thanks to Dr. Birgit Jung, from the Respiratory Department at BI, for her teaching and explanations concerning lung anatomy and physiology; Kerstin Butscher and Mathilde Bosch for their professional guidance in working with lungs; Dr. Carina Ittrich for her precious help with the statistical studies; Michael Rupp and Elmar Schuck for their invaluable assistance in the maintenance and improvement of the ventilator; Dr. Gerald Birk for his support in histological analysis. Mein Dank geht auch an Dr. Birgit Jung, aus der Abteilung Atemwegsforschung, für ihre Erklärungen der Lungenanatomie und –physiologie; Kerstin Butscher und Mathilde Bosch für ihre professionelle Unterstützung bei der Arbeit mit Lungen; Dr. Carina Ittrich für ihre wertvolle Hilfe bei statistischen Studien; Michael Rupp und Elmar Schuck für ihren unschätzbaren Einsatz bei der Wartung und Verbesserung des Ventilators; Dr. Gerald Birk für seinen Beistand bei der histologischen Analyse.

I also want to thank my colleagues from the Drug Discovery Support Department, in particular Christine Bruckmaier, for her help in administrative formalities. She and her family's kindness have encouraged me to continue learning German. I wish to express my gratitude to Dr. Udo Maier and the Target Discovery Research Department to provide me the opportunity to continue working, researching and learning more. **Ich danke auch meinen Kollegen aus der Abteilung Drug Discovery Support, besonders Christine Bruckmaier für ihre Hilfe bei allen administrativen Formalitäten. Sie und ihre Familie haben mich stets ermutigt, Deutsch zu lernen.**

I want to express my appreciation to the group in Fundación Jiménez Díaz, Dr. Germán Peces-Barba, Dr. Laura del Puerto and Dr. Sandra Pérez for their knowledge in pulmonary issues and for helping me improve my skills in animal handling. **Quiero expresar mi agradecimiento al grupo de la Fundación Jiménez Díaz, Dr. Germán Peces-Barba, Dra. Laura del Puerto y Dra. Sandra Pérez por sus conocimientos en cuestiones pulmonares y por ayudarme a mejorar mi habilidad en el manejo de animales.**

I would like to thank all PHeLNet fellows, who started being colleagues and ended up being friends. I especially want to mention Zahir for his explanations concerning helium polarization, for each gas delivery and for preparing the gas mixture I needed for my experiments which meant extra work for him; Guilhem for his enthusiasm and the great time working together in the PHeLNet workshop organization; Kasia for her unconditional support and continuous encouragement from the distance, her useful advice and her friendship.

I want to express my sincerest gratitude to Ana, Frank, Greta, Helena and Lia. They opened their arms to make me to be part of their family. **Quero expressar meus sinceros votos de gratidão para Ana, Frank, Greta, Helena e Lia. Eles abriram seus braços para tornar-me parte de sua família.**

I would also like to thank Michaela Bücheler, my German teacher, my English teacher and my early Monday morning's confidant. **Quiero agradecer también a Michaela Bücheler, mi profesora de alemán, mi profesora de inglés y mi confidente en las mañanas de los lunes.**

I want to express my gratefulness to all the good friends I met in Biberach over these last years: Thuy, Joy, Marion, Tommi, Kathrin, Remek, Carlos, Adriana, Jamil, Laura ..., Osmay. All

of them have made me be aware of how big, diverse and wonderful the world is. In particular Thuy and Joy, with whom I hope to continue discovering Germany and the rest of the world; Marion and Tommi who have made a great effort to teach me “Hochdeutsch”; Osmay who taught me that the problems do not exist, we create them...

Finally, I wish to thank my family for everything I am. This thesis would have been impossible without their invaluable support and eternal patience and love. *Finalmente, deseo dar las gracias a mi familia, por todo lo que soy. Esta tesis hubiera sido imposible sin su inestimable apoyo, su eterna paciencia y amor.*

This work has been performed with the financial support from the European Network PHeLInet (MRTN-CT-2006-36002) and Boehringer Ingelheim Pharma (Drug Discovery Support and Target Discovery Research), both institutions I am sincerely grateful to.

INDEX/ ÍNDICE

Acknowledgements/ Agradecimientos/ Dankbarkeiten

PART I: INTRODUCTION

1. Motivation, objectives and text organization/ Motivación, objetivos y organización del texto (Page 11 / Pag. 18)
2. Anatomy, physiology and pathology of the lung (Page 21)
 - 2.1. Lung anatomy and physiology (Page 23)
 - 2.2. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Page 27)
 - 2.3. Mechanical ventilation (Page 29)
 - 2.4. Lung histology (Page 31)
3. Magnetic Resonance Imaging of Gases: Diffusion measurements (Page 35)
 - 3.1 Hyperpolarized gases (Page 38)
 - 3.2 Fluorinated gases (Page 41)
 - 3.3 Principles of diffusion (Page 42)
 - 3.4 Measurement of diffusion by MR (Page 46)
 - 3.5 Acquisition of diffusion weighted images: COMSPIRA sequence (Page 48)

PART II: HP³He EXPERIMENTATION/ PARTE II: EXPERIMENTACIÓN CON HP³He

4. Experimental setup and methodology for HP³He MRI measurements/ Dispositivo experimental y metodología para experimentación con HP³He (Page 55 / Pag. 71)
 - 4.1. Setup of the ventilation system and MR scanner/ Características del sistema de ventilación y escáner de RM (Page 57 / Pag. 71)
 - 4.2. Animal preparation/ Preparación de los animales para la experimentación (Page 61 / Pag. 74)
 - 4.3. Ventilation protocol/ Protocolo de Ventilación (Page 62 / Pag. 75)
 - 4.4. Imaging protocol/ Protocolo de Imagen (Page 65 / Pag. 76)
 - 4.5. ADC calculation and statistic analysis/ Cálculo del ADC y análisis estadístico (Page 67 / Pag. 77)

5. Role of certain parameters on ADC measurement: standard ventilation method/ Papel de ciertos parámetros en las medidas de ADC: método de ventilación estándar (Page 79 / Pag. 100)
 - 5.1. Depolarization of the HP^3He over time/ Despolarización del HP^3He con el tiempo (Page 81 / Pag. 101)
 - 5.2. Effect of the number of prewashes on ADC values/ Efecto del número de prelavados sobre el ADC (Page 83 / Pag. 101)
 - 5.3. Effect of PEEP application on ADC and SNR measurements / Efecto de la aplicación de un PEEP en las medidas de ADC y SNR (Page 85 / Pag. 102)
 - 5.4. ADC reproducibility over ventilation time/ Reproducibilidad del ADC con el tiempo de ventilación (Page 88 / Pag. 104)
 - 5.5. ADC maps/ Mapas de ADC (Page 92 / Pag. 105)
 - 5.6. Lung area measurements/ Medidas del área pulmonar (Page 93 / Pag. 106)
 - 5.7. ADC comparison between healthy and emphysematous animals/ Comparación de ADC entre animales sanos y enfisematosos (Page 94 / Pag. 106)
 - 5.8. Discussion and Conclusions/ Discusión y Conclusiones (Page 96 / Pag. 107)
6. Effect of gases concentration on ADC measurements: comparison between two ventilation methods/ Efecto de la concentración de gases en la medida de ADC: comparación entre dos métodos de ventilación distintos (Page 111 / Pag. 126)
 - 6.1. Different gases concentrations and lung volumes/ Diferentes concentraciones de gases y volúmenes pulmonares (Page 114 / Pag. 127)
 - 6.2. Gas mixture calculation and proposed ventilation method: VOHeM/ Cálculo de la mezcla de gases y método de ventilación propuesto: VOHeM (Page 117 / Pag. 127)
 - 6.3. Comparison between proposed (VOHeM) and standard method/ Comparación entre el método propuesto (VOHeM) y el método estándar (Page 119 / Pag. 128)
 - 6.4. Discussion and Conclusions/ Discusión y Conclusiones (Page 122 / Pag. 129)
7. Application and validation of VOHeM method: Comparison between healthy and whole- and mono-lobular elastase-treated animals / Aplicación y validación del método VOHeM: comparación entre animales sanos e instilados en pulmón completo y mono-lobular (Page 133 / Pag. 151)
 - 7.1 Methodology/ Metodología (Page 136 / Pag. 152)
 - 7.2 ADC differences between left and right lung in whole-lung induced animals/ Diferencias de ADC entre pulmón izquierdo y derecho en animales inducidos en pulmón completo (Page 137 / Pag. 153)

7.3 Application of VOHeM method to compare between healthy and emphysematous whole-lung induced animals at different ventilation conditions/ [Aplicación del método VOHeM para comparar animales sanos y enfisematosos inducidos en pulmón completo a diferentes condiciones de ventilación](#) (Page 138 / [Pag. 154](#))

7.4 Application of VOHeM method in mono-lobular elastase-induced animals: measurements at different ventilation conditions/ [Aplicación del método VOHeM en animales inducidos con elastasa en un solo lóbulo \(mono-lobular\): Medidas a diferentes condiciones de ventilación](#) (Page 140 / [Pag. 155](#))

7.5 Discussion/ [Discusión](#) (Page 147 / [Pag. 157](#))

PART III: ¹⁹F EXPERIMENTATION/ PARTE III: EXPERIMENTACIÓN CON ¹⁹F

8. In-vivo diffusion weighting imaging using fluorinated gases: SF₆ and C₂F₆/ [Imágenes de difusión en-vivo con gases fluorados: SF₆ y C₂F₆](#) (Page 161 / [Pag. 183](#))

8.1 Methods for ¹⁹F-MRI experiments/ [Metodología para la experimentación con ¹⁹F en RM](#) (Page 163 / [Pag. 183](#))

8.2 MRI experiments with SF₆/ [Medidas de ADC con SF₆](#) (Page 165 / [Pag. 185](#))

8.2.1 SF₆ phantom measurements/ [Obtención del ADC en un Phantom de SF₆](#) (Page 165 / [Pag. 185](#))

8.2.2 In-vivo MRI experiment using SF₆/ [Obtención del ADC con SF₆ en experimentación "in vivo"](#) (Page 167 / [Pag. 186](#))

8.3 MRI experiments with C₂F₆/ [Medidas de ADC con C₂F₆](#) (Page 169 / [Pag. 187](#))

8.3.1 C₂F₆ phantom measurements/ [Obtención del ADC en un Phantom de C₂F₆](#) (Page 169 / [Pag. 187](#))

8.3.2 In-vivo MRI experiment using C₂F₆/ [Obtención del ADC con C₂F₆ en experimentación "in vivo"](#) (Page 173 / [Pag. 189](#))

8.4 Discussion/ [Discusión](#) (Page 179 / [Pag. 192](#))

9. Summary and Conclusions/ [Resumen y Conclusiones](#) (Page 195 / [Pag. 202](#))

[Appendix](#) (Page 204)

[List of Figures / Lista de Figuras](#) (Page 213)

[List of Tables/ Lista de Tablas](#) (Page 219)

[List of Abbreviations](#) (Page 221)

Chapter 1

**Motivation, objectives and text
organization**

**Motivación, objetivos y organización del
texto**

Chapter 1

Motivation

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is expected to rank third as a cause of mortality and fifth of morbidity by the year 2020 (1). Emphysema is considered the late stage of COPD and it is characterized by destruction of the alveolar walls and loss of tissue density.

Conventional methods to diagnose and evaluate emphysema include pulmonary function tests (PFTs), chest radiography and computed tomography (CT). Pulmonary markers obtained from PFTs, along with conventional chest radiography, only provide a gross assessment of the state of emphysema. CT, by comparison, proves to be more sensitive to early emphysematous changes. However, this technique exposes the subjects to ionizing radiation which limits its application in longitudinal studies and treatments.

A validated imaging technique sensitive enough to detect changes in lung microstructure would be very helpful in an early diagnose of emphysema and in the design of therapy and drug development to treat COPD.

MRI using hyperpolarized gases (HP-gases) emerged as a promising technique capable of providing further physiological insight into both structure (2-4) and function (5-7). Moreover, the non-exposure to ionizing radiation makes HP-gas MRI noninvasive and suitable for monitoring of the progression of emphysema.

Inhalation of these HP-gases derives information related, among others, to the size of the alveoli by means of apparent diffusion coefficient (ADC) measurements. If the diffusion of the gas is restricted by the boundaries of the airspace structures, the measured ADC values reflect this restriction. Thus, larger air spaces restrict less the diffusion of the HP-gas resulting in elevated ADC values. Therefore, ADC measurements have been widely extended to detect emphysema as changes in alveolar size. Its efficacy has been demonstrated (3, 8-10), however, the dependency of ADC on other parameters such as posture and degree of lung inflation among others has also been proved (11-16). This can potentially affect the outcome yielding to a misinterpretation of the results.

MRI with fluorinated gases is a relatively new method. So far, it has not been widely investigated maybe due to the fact that it yields much lower signal than hyperpolarized gases MRI. The most suited and utilized fluorinated gases in MRI are SF₆, CF₄ and C₂F₆ (17-24). Lately, C₃F₈ has been also considered to be studied, e.g. in explanted human lungs experiments.

Objectives

One of the aims of this thesis is to obtain reliable, consistent and reproducible ADC measurements performed with a single breath-hold of HP³He in small animals. To this purpose, a new ventilation method, called VOHeM, will be proposed. The special feature of this method is to minimize the dependency of ADC measurements on the gases and their concentrations used to ventilate the animals during the experiment. The efficacy of this method will be demonstrated not only in control animals but also in comparisons between healthy and emphysematous (elastase-treated) lungs. Moreover, the ADC measurements will be carried out using different ventilation parameters in order to determine the conditions at which the ADC values provide the most clearly ADC differences between healthy and emphysematous tissue.

In addition, ADC measurements will also be performed in mono-lobar elastase-treated rats. For the first time small animals are induced with elastase in only one lung. VOHeM method will be applied to these animals and the results will be compared to the ones obtained from whole-induced animals. This procedure will permit to reduce the number of studied subjects by a half and to remove the inter-subject variability.

All HP-gas experiments will be performed in a single breath-hold with the intention of minimizing the amount of consumed HP³He thus reducing the experimental costs.

Finally, ¹⁹F imaging data obtained with SF₆ and C₂F₆ will be shown. For the first time, diffusion weighted MR images will be acquired with C₂F₆ in both control and elastase-treated rats. Moreover, we will show significant ADC differences between healthy and emphysematous tissue due to different diffusion restrictions.

Text organization

This thesis is divided in three parts consisting in total of eight chapters.

PART I (Chapters 1-3): Motivation, objectives and text organization. Introduction of lung physiology and anatomy. Magnetic Resonance Imaging (MRI) of gases: diffusion measurements.

PART II (Chapters 4-7): Common methodology to all HP³He experiments. ADC measurements with HP³He.

PART III (Chapter 8): Diffusion MRI of fluorinated gases.

As epilogue a summary of the results and the most important conclusions obtained in this investigation work is given.

References

1. Gulsvik A. The global burden and impact of chronic obstructive pulmonary disease worldwide. *Monaldi Arch Chest Dis* 2001;56:261-264.
2. Altes TA, Mata J, de Lange EE, Brookeman JR, Mugler JP, III. Assessment of lung development using hyperpolarized helium-3 diffusion MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2006;24(6):1277-1283.
3. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of ³He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
4. Diaz S, Casselbrant I, Piitulainen E, Magnusson P, Peterson B, Wollmer P, Leander P, Ekberg O, Akeson P. Validity of apparent diffusion coefficient hyperpolarized ³He-MRI using MSCT and pulmonary function tests as references. *Eur J Radiol* 2009;71(2):257-263.
5. Deninger AJ, Eberle B, Ebert M, Grossmann T, Heil W, Kauczor H, Lauer L, Markstaller K, Otten E, Schmiedeskamp J, Schreiber W, Surkau R, Thelen M, Weiler N. Quantification of regional intrapulmonary oxygen partial pressure evolution during apnea by (³)He MRI. *J Magn Reson* 1999;141(2):207-216.
6. Fain SB, Korosec FR, Holmes JH, O'Halloran R, Sorkness RL, Grist TM. Functional lung imaging using hyperpolarized gas MRI. *J Magn Reson Imaging* 2007;25(5):910-923.

7. Yu J, Rajaei S, Ishii M, Law M, Emami K, Woodburn JM, Kadlecsek S, Vahdat V, Rizi RR. Measurement of pulmonary partial pressure of oxygen and oxygen depletion rate with hyperpolarized helium-3 MRI: a preliminary reproducibility study on pig model. *Acad Radiol* 2008;15(6):702-712.
8. Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J, Cremillieux Y, Rodriguez I, Dupuich D, Callot V, Ortega M, Rubio Arbo ML, Cortijo M, Gonzalez-Mangado N. Helium-3 MRI diffusion coefficient: correlation to morphometry in a model of mild emphysema. *Eur Respir J* 2003;22(1):14-19.
9. Saam BT, Yablonskiy DA, Kodibagkar VD, Leawoods JC, Gierada DS, Cooper JD, Lefrak SS, Conradi MS. MR imaging of diffusion of (3)He gas in healthy and diseased lungs. *Magn Reson Med* 2000;44(2):174-179.
10. Salerno M, de Lange EE, Altes TA, Truwit JD, Brookeman JR, Mugler JP, III. Emphysema: hyperpolarized helium 3 diffusion MR imaging of the lungs compared with spirometric indexes--initial experience. *Radiology* 2002;222(1):252-260.
11. Diaz S., Casselbrant I., Piitulainen e., Pettersson G., Magnusson P., Peterson B., Wollmer P., Leander P., Ekberg O., Akesson P. Hyperpolarized 3He Apparent Diffusion Coefficient MRI of the Lung: Reproducibility and Volume Dependency in Healthy Volunteers and Patients With Emphysema. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:763-770.
12. Evans A, McCormack DG, Ouriadov A, Etemad-Rezai R, Santyr GE, Parraga G. Anatomical Distribution of 3He Apparent Diffusion Coefficients in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Magn Reson Imaging* 2007;26:1537-1547.
13. Fichele S, Woodhouse N, Swift AJ, Said Z, Paley MN, Kasuboski L, Mills GH, van Beek EJ, Wild JM. MRI of helium-3 gas in healthy lungs: posture related variations of alveolar size. *J Magn Reson Imaging* 2004;20(2):331-335.
14. Gierada DS, Woods JC, Bierhals AJ, Bartel ST, Ritter JH, Choong CK, Das NA, Hong C, Pilgram TK, Chang YV, Jacob RE, Hogg JC, Battafarano RJ, Cooper JD, Meyers BF, Patterson GA, Yablonskiy DA, Conradi MS. Effects of diffusion time on short-range hyperpolarized (3)He diffusivity measurements in emphysema. *J Magn Reson Imaging* 2009;30(4):801-808.
15. Schreiber WG, Morbach AE, Stavngaard T, Gast KK, Herweling A, Sogaard LV, Windirsch M, Schmiedeskamp J, Heussel CP, Kauczor HU. Assessment of lung microstructure with magnetic resonance imaging of hyperpolarized Helium-3. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;148(1-2):23-42.
16. Waters B, Owers-Bradley J, Silverman M. Acinar Structure in Symptom-free Adults by Helium-3 Magnetic Resonance. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:847-851.
17. Adolphi NL, Kueth DO. Quantitative mapping of ventilation-perfusion ratios in lungs by 19F MR imaging of T1 of inert fluorinated gases. *Magn Reson Med* 2008;59(4):739-746.
18. Jacob RE, Chang YV, Choong CK, Bierhals A, Zheng HD, Zheng J, Yablonskiy DA, Woods JC, Gierada DS, Conradi MS. 19F MR imaging of ventilation and diffusion in excised lungs. *Magn Reson Med* 2005;54(3):577-585.
19. Kueth DO, Caprihan A, Gach HM, Lowe IJ, Fukushima E. Imaging obstructed ventilation with NMR using inert fluorinated gases. *J Appl Physiol* 2000;88(6):2279-2286.

20. Perez-Sanchez JM, Perez de AR, Rodriguez I, Cortijo M, Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J. In vivo diffusion weighted ^{19}F MRI using SF_6 . *Magn Reson Med* 2005;54(2):460-463.
21. Ruiz-Cabello J, Barnett BP, Bottomley PA, Bulte JW. Fluorine (^{19}F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed* 2010.
22. Scholz AW, Wolf U, Fabel M, Weiler N, Heussel CP, Eberle B, David M, Schreiber WG. Comparison of magnetic resonance imaging of inhaled SF_6 with respiratory gas analysis. *Magn Reson Imaging* 2009;27(4):549-556.
23. Schreiber WG, Eberle B, Laukemper-Ostendorf S, Markstaller K, Weiler N, Scholz A, Burger K, Heussel CP, Thelen M, Kauczor HU. Dynamic ^{19}F -MRI of pulmonary ventilation using sulfur hexafluoride (SF_6) gas. *Magn Reson Med* 2001;45(4):605-613.
24. Wolf U, Scholz A, Heussel CP, Markstaller K, Schreiber WG. Subsecond fluorine-19 MRI of the lung. *Magn Reson Med* 2006;55(4):948-951.

Capítulo 1: Motivación, objetivos y organización del texto

Motivación

Se estima que el COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) constituye la tercera causa de mortalidad y la quinta de morbilidad en el año 2020 **(1)**. El enfisema está considerado como la etapa final del COPD y se caracteriza por la destrucción de las paredes alveolares y la pérdida de densidad del tejido pulmonar.

Los métodos convencionales para diagnosticar y evaluar el enfisema, incluyen test de función pulmonar (PFTs), radiografía de pecho y tomografía computarizada (CT). Los marcadores pulmonares obtenidos de los PFTs, junto con la radiografía convencional de pecho, solamente proporcionan una vasta valoración del estado del enfisema. En comparación, la tomografía computarizada demuestra ser más sensible a los primeros síntomas del enfisema. Sin embargo, esta técnica produce radiación ionizante que limita su utilización en estudios ó tratamientos de larga duración.

Una técnica validada de imagen con suficiente sensibilidad para detectar cambios en la microestructura pulmonar sería de gran ayuda tanto para un diagnóstico precoz como para el diseño de terapias y desarrollo de medicamentos para combatir el COPD.

La Imagen de Resonancia Magnética (MRI) usando gases hiperpolarizados (gases HP) emergió como una técnica prometedora capaz de proveer una mayor comprensión tanto anatómica **(2-4)** como fisiológica **(5-7)** del pulmón. Además, la no exposición a radiación ionizante, hace a la técnica de MRI con gases hiperpolarizados no invasiva y adecuada para monitorizar el desarrollo del enfisema.

Con la inhalación de estos gases hiperpolarizados se obtiene información relacionada, entre otras, con el tamaño de los alveolos, mediante medidas de ADC (Coeficiente de Difusión Aparente). Si la difusión del gas está restringida dentro de los espacios aéreos, los valores de ADC medidos reflejarán esta restricción. Así, valores de ADC más elevados provienen de espacios de aire mayores. Por ello que la medición del ADC se haya extendido ampliamente para detectar enfisema en base a cambios en el tamaño alveolar. Aunque se ha demostrado su eficacia **(3, 8-10)**, también se ha observado la dependencia del ADC con otros parámetros

como la postura o el grado de inflación del pulmón **(11-16)**. Esto puede conllevar a una mala interpretación de los resultados.

Por otro lado, la Imagen de Resonancia Magnética con gases fluorados es un método que representa un nuevo enfoque de esta técnica. Hasta ahora, no se ha investigado ampliamente debido a que proporciona una intensidad de señal mucho más baja que los gases hiperpolarizados **(17-24)**. Los gases fluorados más utilizados en MRI son: SF₆, CF₄ y C₂F₆, aunque últimamente también se ha estudiado en pulmones extirpados de humanos el C₃F₈.

Objetivos

Uno de los objetivos de esta Tesis ha sido obtener medidas fiables, consistentes y reproducibles de ADC en animales pequeños llevadas a cabo con una simple apnea de HP³He. Con este propósito, se propondrá un nuevo método de ventilación, que denominamos VOHeM (Ventilation with Oxygen and Helium Mixture). La particularidad de este método está en que minimiza la dependencia de las medidas de ADC de los gases y de sus concentraciones usadas para ventilar a los animales durante el experimento. La eficacia de este método se demostrará no solo en animales control, sino también comparando pulmones sanos con pulmones enfisematosos (tratados con elastasa). Además, las medidas de ADC se tomarán usando diferentes parámetros de ventilación aplicados tanto a animales control como a inducidos con elastasa. Esto servirá para determinar que parámetros proporcionan unas diferencias más claras de ADC cuando se comparan tejidos sanos y enfisematosos.

Las medidas de ADC se llevarán a cabo también, en ratas tratadas con elastasa con inducción mono-lobular. Por primera vez esta técnica de instilación en un solo pulmón se realizara en animales pequeños. El método VOHeM se aplicará a estos animales y los resultados se compararán a los obtenidos en animales inducidos en pulmón completo. Este procedimiento presenta grandes ventajas ya que permite reducir a la mitad el número de sujetos a estudiar y eliminar la variabilidad inter-sujetos.

Todos los experimentos con gases hiperpolarizados serán llevados a cabo durante una apnea, con la intención de minimizar la cantidad de HP^3He , reduciendo de forma considerable el coste económico.

Finalmente, se mostrarán las imágenes de flúor obtenidas usando SF_6 y C_2F_6 . Por primera vez se adquirirán imágenes de difusión obtenidas con C_2F_6 en ratas control y ratas tratadas con elastasa. Además, se mostrarán diferencias significativas en la restricción de la difusión del C_2F_6 (diferencias en ADC) entre pulmones sanos y enfisematosos.

Organización del texto

Este trabajo de Investigación está dividido en tres partes con un total de ocho capítulos.

PARTE I (Capítulos 1-3): Motivación, objetivos y organización del texto. Introducción a la fisiología y anatomía del pulmón. Imagen por Resonancia Magnética: medidas de difusión.

PARTE II (Capítulos 4-7): Metodología común a todos los experimentos realizados con helio hiperpolarizado. Medición del ADC con HP^3He .

PARTE III (Capítulo 8): Experimentos de difusión con imagen de resonancia magnética de gases fluorados.

Como epílogo un resumen de los resultados y las conclusiones más importantes del trabajo de investigación se muestran al final de la tesis.

Chapter 2

Anatomy, physiology and pathology of the lung

Chapter 2: Anatomy, physiology and pathology of the lung

2.1 Lung anatomy and physiology

2.2 Chronic Obstructive Pulmonary Disease

2.3 Mechanical ventilation

2.4 Lung histology

The lung is the essential respiration organ whose principal function is to transport oxygen from the atmosphere into the bloodstream, and to release carbon dioxide from the bloodstream into the atmosphere. This exchange of gases is accomplished in the smallest structure (alveoli) which forms the pulmonary parenchyma.

2.1 Lung anatomy and physiology

The morphology of rat lung is shown in **Figure 2.1**. The left lung consists of one single lobe while the right lung is divided into four lobes.

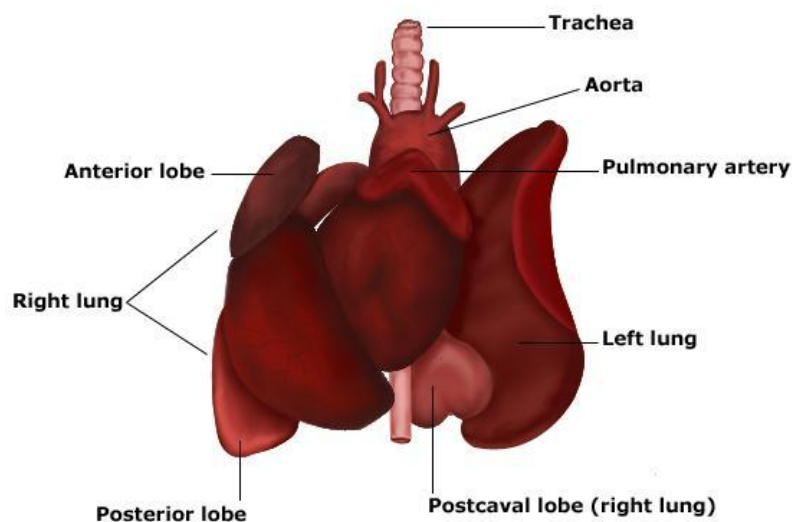


Figure 2.1

Anatomy of the rat lung. Adapted from (1)

The trachea divides into the two main bronchi that enter the roots of the lungs. The bronchi continue to divide within the lung, and after multiple divisions, give rise to bronchioles. The

bronchial tree continues branching until it reaches the level of terminal bronchioles, which lead to alveolar sacs. Alveolar sacs are made up of clusters of alveoli. The tracheobronchial tree consists of several levels of bifurcating airways. The number of bifurcations varies from animal species. A pictorial representation of the human pulmonary tree is shown in **Figure 2.2**. The conducting airways (approximately the first 15 levels in human lungs) only represent about 7% of the total gas volume. The last generations (9-10 for humans) are short in length and comprise a region of diffusive transport (diffusive or respiratory zone) **(2)**. The respiratory zone consists of respiratory bronchioles, alveolar ducts, sacs, and alveoli. Oxygen from the air diffuses into blood capillaries surrounding the alveoli. At the same time CO_2 diffuses from the blood capillaries into the alveoli and out of the lungs with each exhalation.

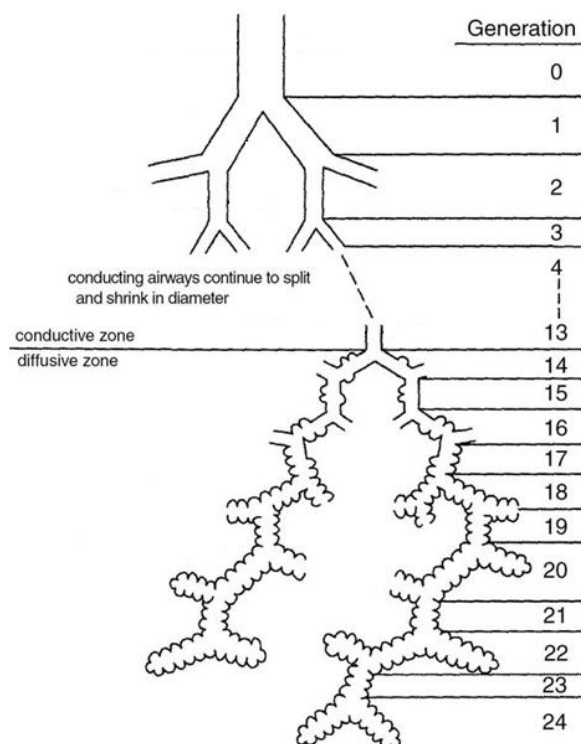


Figure 2.2

Scheme of a pulmonary tree showing the airways generations in the conducting and diffusive zones. The number of the bifurcations is given for human lungs.

*Adapted from J. West **(2)***

Lung volumes and lung capacities (**Figure 2.3**) refer to the volume of air associated with different phases of the respiratory cycle. Lung volumes are directly measured while lung

capacities are inferred from lung volumes. The following definitions of the lung volumes and capacities are given in the AARC Clinical Practice Guideline (3):

- Tidal volume (TV): the volume of gas that is inhaled or exhaled in a single normal breath.
- Inspiratory reserve volume (IRV): maximal volume that can be inspired over the inspiration of a tidal volume.
- Expiratory reserve volume (ERV): maximal volume of gas that can be expired after the exhalation of a tidal volume.
- Residual volume (RV): volume of gas remaining in the lung at the end of a maximal expiration. It cannot be measured by spirometry but it may be calculated by subtracting ERV from FRC ($RV = FRC - ERV$) or by subtracting vital capacity (VC) from total lung capacity, or TLC ($RV = TLC - VC$).
- Inspiratory capacity (IC): maximal volume of gas that can be inhaled from the tidal-volume end-expiratory level (ie, FRC). It is equal to the sum of TV and IRV.
- Functional residual capacity (FRC): volume of gas remaining in the lung after normal expiration. It cannot be measured by spirometry because it includes residual volume ($ERV + RV$).
- Vital capacity (VC): volume change that occurs between maximal inspiration and maximal expiration. The subdivisions of the VC include TV, IRV and ERV.
- Total lung capacity (TLC): volume of gas in the lung at the end of a maximal inspiration. It is usually calculated in one of two ways: (1) $TLC = RV + VC$ or (2) $TLC = FRC + IC$.
- Thoracic gas volume (TGV): volume of gas in the thorax at any point in time and at any level of thoracic expansion.

Lung compliance refers to either dynamic or static state. Static lung compliance, C , is the change in volume for any given applied pressure, $C = \Delta V / \Delta P$, and it is a measure of the lung elasticity. Dynamic lung compliance (smaller than the static) is the compliance of the lung at any given time during actual movement of air. Lung compliance exhibits hysteresis (different compliance on inspiration and expiration phase for identical volumes).

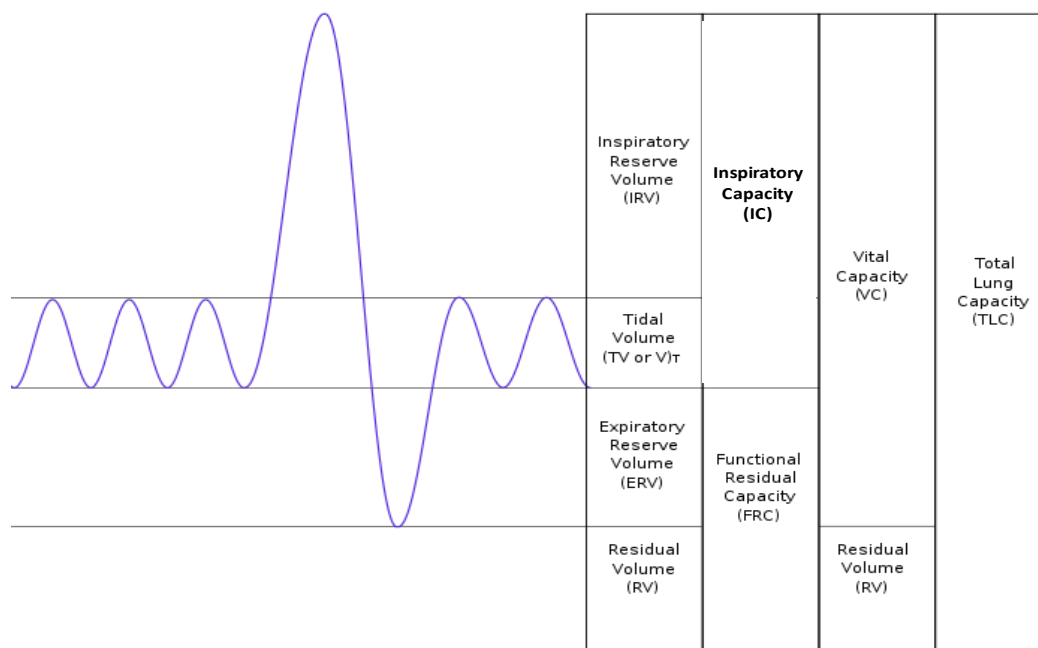


Figure 2.3

Pictorial representation of lung volumes and lung capacities. Adapted from (4).

Lung parameter	Value
Total Lung Capacity, TLC	11 ml
Residual Volume, RV	1.5 ml
Vital Capacity, VC	9.5 ml
Tidal Volume, TV	1.7 ml
Respiratory frequency	110 min ⁻¹
Compliance	0.6 ml/mbar

Table 2.1

Typical lung parameters of a representative 300 g rat. Obtained from (5).

2.2 Chronic Obstructive Pulmonary Disease

COPD is considered to be one of the diseases with a high rate of mortality. Its features are chronic bronchitis, emphysema, small airway remodeling and pulmonary hypertension (6). Emphysema is pathologically defined by the American Thoracic Society and the European Respiratory Society as the presence of permanent enlargement of the airspaces distal to the terminal bronchioles, accompanied by destruction of their walls and without obvious fibrosis (7).

Emphysema is the late stage of COPD and causes the destruction of air space walls reducing the surface area available for the exchange of oxygen and carbon dioxide during breathing. It also reduces the elasticity of the lung itself, which results in a loss of support for the airways that are embedded in the lung. These airways are more likely to collapse causing further limitation to airflow (8).

There are two types of emphysema, centrilobular or centriacinar and panlobular or panacinar (Figure 2.4). In the first one, the respiratory bronchiole, proximal and central part of the acinus, is expanded while the distal acinus or alveoli are unchanged. In panacinar emphysema, the entire respiratory acinus, from respiratory bronchiole to alveoli, is expanded.

Emphysema has been studied using different animal models: smoke-cigarette exposure (9, 10), cadmium-chloride inhalation (CdCl_2) (11), porcine pancreatic elastase instillation (9, 11-14). However, all of them cause different anatomical lesions and therefore different functional lesions. Wright et al. (6) listed pros and cons of different COPD animal models. Since there is a great variation in the pattern of COPD among humans, it is particularly difficult to choose one animal model as the best one. It was stated that elastase produces an emphysema similar to the human paracinar emphysema, while the combination of CdCl_2 and the agent β -aminopropionitrile (β -APN) causes a centriacinar-like emphysema (11).

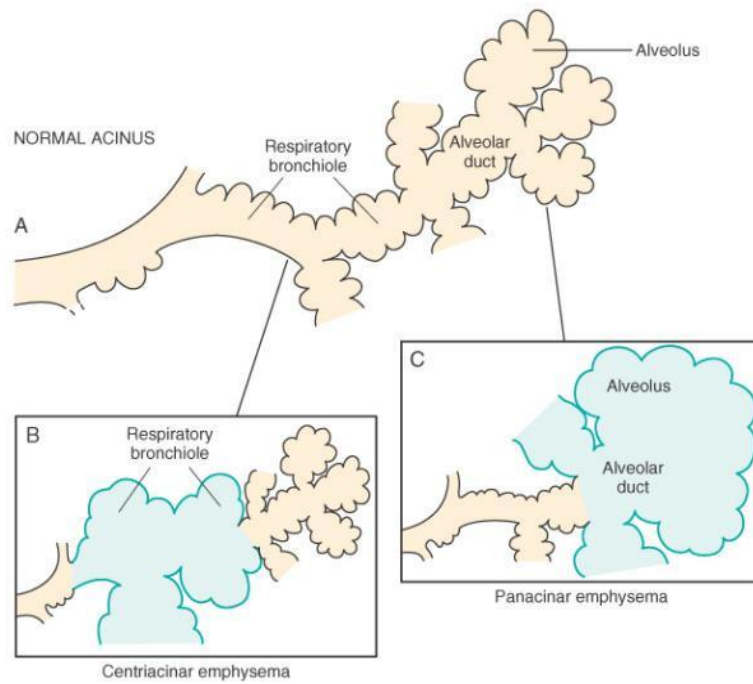


Figure 2.4

Representation of the respiratory bronchiole, alveolar ducts and alveoli: A) normal acinus, B) centriacinar emphysema and C) panacinar emphysema. Adapted from (15).

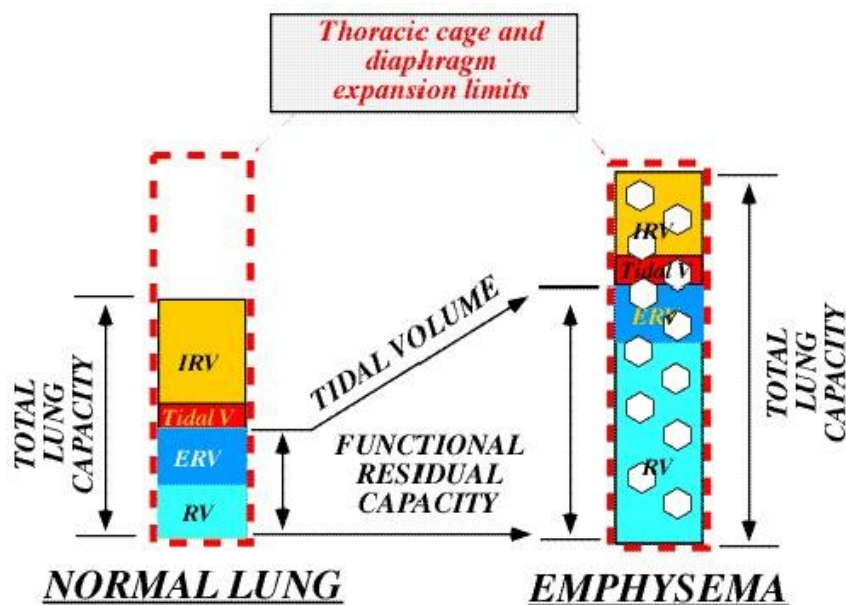


Figure 2.5

Comparative scheme of the most important lung volumes in healthy and emphysematous lungs. Adapted from (16).

In emphysema, the elastic tissue is damaged and the lungs are more compliant due to the poor elastic recoil. Emphysematous subjects often have noticeably broader chests because they are breathing at larger volumes. They have no problem inflating the lungs but have extreme difficulty exhaling air. In this condition extra work is required to get air out of the lungs. Moreover, emphysema is associated with an increase of the residual volume (**Figure 2.5**) (**8**).

Spirometry is a test that measures the forced expiratory volume in one second (FEV_1), which is the greatest volume of air that can be breathed out in the first second of a large breath. It also measures the forced vital capacity (FVC), which is the greatest volume of air that can be breathed out in a whole large breath. Normally, at least 70% of the FVC comes out in the first second.

In humans the GOLD criteria is commonly used to diagnose the severity of COPD (**Table 2.2**). The FEV_1 (measured after bronchodilator medication) is expressed as a percentage of a predicted "normal" value based on a person's age, gender, height and weight.

Severity of COPD (GOLD scale)	FEV_1 % predicted
Mild (GOLD 1)	≥ 80
Moderate (GOLD 2)	50–79
Severe (GOLD 3)	30–49
Very severe (GOLD 4)	<30 or chronic respiratory failure symptoms

Table 2.2

GOLD criteria for COPD diagnosis

2.3 Mechanical ventilation

In medicine, mechanical ventilation is an artificial method to assist or replace spontaneous breathing. It can be negative-pressure ventilation, where air is essentially sucked into the lungs, or positive pressure ventilation, where air (or another gas mixture) is pushed into the trachea. The ventilation is performed by insertion of a tube, intra-tracheal or tracheostomy, into the trachea.

Modes of ventilation are classified depending on what determines the end of the inspiration. This is sensed by either pressure or volume.

Volume ventilation mode: A predetermined tidal volume (TV) is set for the subject and is delivered with each inspiration. The amount of pressure necessary to deliver this volume will fluctuate based on the compliance of the subject and positive end expiratory pressure (PEEP). Upon completion of the inspired volume, the ventilator will open a valve allowing the subject to passively exhale.

Pressure ventilation: A predetermined peak inspiratory pressure (PIP) is fixed. The ventilator will push gas into the subject until this set pressure is reached. Upon reaching the preset PIP, the ventilator allows for passive exhalation.

Mechanical ventilation is often a life-saving intervention, but carries potential complications which can induce temporal variations in lung structure and function (17). In extreme cases these changes end up becoming lung tissue damage (17, 18) which is known as Ventilator Induced Lung Injury (VILI). In order to avoid any damage to the tissue during prolonged mechanical ventilation, protective ventilation strategies have been developed, being the application of a PEEP one of the most popular (19). PEEP refers to the use of an elevated pressure during the expiratory phase of the breathing cycle. After delivery of the set amount of air by the ventilator, the subject exhales passively, but the lungs do not deflate completely at the end of each breathing cycle. PEEP is thought to protect the lungs from mechanical injury by minimizing the stress associated with the repeated opening and collapsing of small airways and alveolar ducts (20, 21) as well as from low tidal volume (19). A high enough PEEP level may stabilize alveolar recruitment, keeping most recruitable alveoli open (22). On the other hand, a relative low tidal volume must be utilized since the combination of a high PEEP with a high tidal volume could lead to an over-inflation (23). The stabilization of alveoli at low tidal volume and high PEEP working synergistically has recently been demonstrated by Halter *et al* (24).

2.4 Histology

The mean linear intercept (Lm), a measure of the surface area to volume ratio, is by large the most commonly reported metric to characterize emphysema. However, its definition, application and the interpretation of results vary among laboratories and scientists. The problem of the inadequate descriptions of the various aspects of emphysema and chronic lung disease was already mentioned by Dunnill in the early 60's (25). A clear and more recent example of this, is a publication (26) consisting of a series of letters to the editor where the meaning of the linear intercept and the procedure to its analysis are discussed.

Several authors have shown significant different values of the mean linear intercept when comparing between healthy and emphysematous tissue, thus they argue the sensitivity of this parameter in the detection of airspaces enlargement (12, 14, 27). Moreover, Lm has also been evaluated together with other metrics, such as mean alveolar internal area (AIA), destructive index (DI), mean airspace chord length or tissue fraction ratio (14, 27, 28). However, there are several arguments against considering the mean linear intercept as an unbiased indicator for emphysema diagnosis due to its inability to recognize differences in comparison with healthy lung (10, 29, 30). Lm is by definition a mean, that is, it is a statistical measure designed to extract the central tendency of distributed data against their variation. Thus, in cases of mild emphysema, in which diseased areas of the lung may be small, dispersed, and heterogeneous with respect to distribution of airspace sizes, it is generally difficult to quantify disease severity with conventional methods, such as Lm, since they tend to underestimate the important influence of subtle localized changes or outliers, due to the averaging to extract the “central tendency” (26).

Recently, a series of indexes (Dv) based on the moment of diameter (d) were introduced as non-conventional metrics by Parameswaran *et al.* (30). They defined these indexes as the ratio of two moments of d:

$$Dv = \frac{\langle d^{v+1} \rangle}{\langle d^v \rangle} \quad v = 0, 1, 2 \dots$$

where $\langle \dots \rangle$ indicates the arithmetic mean. Thus, D_0 is the arithmetic mean of the airspace diameter, D_1 is a function of the mean (μ) and the variance (σ^2) of the diameter distribution

and D_2 is a function of μ , σ^2 and the skewness (γ) of the diameter distribution. D_1 and D_2 are given by the following equations:

$$D_1 = D_0 \left(1 + \frac{\sigma^2}{D_0^2} \right)$$

$$D_2 = D_0 \left[1 + \frac{\sigma^2}{D_0^2 + \sigma^2} \left(2 + \frac{\sigma\gamma}{D_0} \right) \right]$$

These authors suggested D_1 and D_2 as indicators of heterogeneously distributed airspace sizes characteristic of early lung disease and concluded that D_2 is more sensitive to the presence of enlarged airspaces in a tissue section than L_m since the largest airspaces - potential indicators of early disease state - are weighted more heavily than smaller ones (30). Jacob *et al.* (10) also concluded from their results that D_2 was better able to distinguish between healthy and smoke-exposed mice than L_m . They attributed this to the fact that D_2 is weighted by enlarged airspaces and is therefore a reflection of the airspace size distribution.

References

1. [Anonymous]. www.tutorvista.com. 2010.
2. West JB. Respiratory Physiology: the essentials. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
3. AARC Clinical Practice Guideline. Static lung volumes. Respir Care 2001;46(5):531-539.
4. [Anonymous]. http://en.wikipedia.org/wiki/Lung_volumes. 2011.
5. Krinke GJ. The laboratory rat. San Diego: Academy Press; 2000.
6. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;295(1):L1-15.
7. [Anonymous]. <http://www.thoracic.org/clinical/copd-guidelines/resources/copddoc.pdf>. 2010.
8. West JB. Pulmonary Pathophysiology: the essentials. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2003.

9. Dugas JP, Garbow JR, Kobayashi DK, Conradi MS. Hyperpolarized (3)He MRI of mouse lung. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1310-1317.
10. Jacob RE, Carson JP, Gideon KM, Amidan BG, Smith CL, Lee KM. Comparison of two quantitative methods of discerning airspace enlargement in smoke-exposed mice. *PLoS One* 2009;4(8):e6670.
11. Rubio ML, Sanchez-Cifuentes MV, Peces-Barba G, Verbanck S, Paiva M, Gonzalez MN. Intrapulmonary gas mixing in panacinar- and centriacinar-induced emphysema in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):237-245.
12. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of 3He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
13. Emami K, Cadman RV, Duffie Woodburn JP, Fischer MC, Kadlecsek SJ, Zhu J, Pickup S, Guyer RA, Law M, Vahdat V, Friscia ME, Ishii M, Yu J, Geftter WB, Shrager JB, Rizi RR. Early Changes of Lung Function and Structure in an Elastase Model of Emphysema - A Hyperpolarized 3He MRI Study. *J Appl Physiol* 2007;00482.
14. Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J, Cremillieux Y, Rodriguez I, Dupuich D, Callot V, Ortega M, Rubio Arbo ML, Cortijo M, Gonzalez-Mangado N. Helium-3 MRI diffusion coefficient: correlation to morphometry in a model of mild emphysema. *Eur Respir J* 2003;22(1):14-19.
15. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8 ed. Saunders; 2010.
16. Nazari S. Mechanical Events In Physiopathology Of Idiopathic Pulmonary Emphysema: A Theoretical Analysis. *The Internet Journal of Pathology* 2002;2(2).
17. Carney DE, Bredenberg CE, Schiller HJ, Picone AL, McCann UG, Gatto LA, Bailey G, Fillinger M, Nieman GF. The Mechanism of Lung Volume Change during Mechanical Ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5):1697-1702.
18. Gatto LA, Fluck RR, Jr. Alveolar mechanics in the acutely injured lung: role of alveolar instability in the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *Respir Care* 2004;49(9):1045-1055.
19. Richard JC, Maggiore SM, Jonson B, Mancebo J, Lemaire F, Brochard L. Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(7):1609-1613.
20. Gajic O, Lee J, Doerr CH, Berrios JC, Myers JL, Hubmayr RD. Ventilator-induced cell wounding and repair in the intact lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1057-1063.
21. Rothen HU, Neumann P, Berglund JE, Valtysson J, Magnusson A, Hedenstierna G. Dynamics of re-expansion of atelectasis during general anaesthesia. *Br J Anaesth* 1999;82(4):551-556.
22. Cereda M, Foti G, Musch G, Sparacino ME, Pesenti A. Positive end-expiratory pressure prevents the loss of respiratory compliance during low tidal volume ventilation in acute lung injury patients. *Chest* 1996;109(2):480-485.
23. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Eur Respir J Suppl* 2003;42:2s-9s.

24. Halter JM, Steinberg JM, Gatto LA, DiRocco JD, Pavone LA, Schiller HJ, Albert S, Lee HM, Carney D, Nieman GF. Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. *Crit Care* 2007;11(1):R20.
25. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962;17:320-328.
26. Weibel ER, Parameswaran H, Majumdar A, Ito S, Alencar AM, Suki B, Mitzner W, Hsia CC, Fehrenbach H, Butler JP. Morphological quantification of emphysema: A debate. *J Appl Physiol* 2006;100:1419-1421.
27. Ito S, Ingenito EP, Arold SP, Parameswaran H, Tgavalekos NT, Lutchen KR, Suki B. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. *J Appl Physiol* 2004;97(1):204-212.
28. Mitzner W. Use of mean airspace chord length to assess emphysema. *J Appl Physiol* 2008;105:1980-1981.
29. Emami K, Cadman RV, Woodburn JM, Fischer MC, Kadlecsek SJ, Zhu J, Pickup S, Guyer RA, Law M, Vahdat V, Friscia ME, Ishii M, Yu J, Gefter WB, Shrager JB, Rizi RR. Early changes of lung function and structure in an elastase model of emphysema--a hyperpolarized ³He MRI study. *J Appl Physiol* 2008;104(3):773-786.
30. Parameswaran H, Majumdar A, Ito S, Alencar AM, Suki B. Quantitative characterization of airspace enlargement in emphysema. *J Appl Physiol* 2006;100(1):186-193.

Chapter 3

Magnetic Resonance Imaging of Gases: Diffusion measurements

Chapter 3: Magnetic Resonance Imaging of gases: Diffusion measurements

3.1 Hyperpolarized gases

3.2 Fluorinated gases

3.3 Principles of diffusion

3.4 Measurement of diffusion by MR

3.5 Acquisition of diffusion weighted images: COMSPIRA sequence

Introduction

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a powerful imaging modality which provides both structural and functional in-vivo information. The major advantage of MRI in comparison to other imaging techniques is its lack of ionizing radiation, which makes it appropriate for long-term studies. MRI offers a variety of parameters which can be modified in order to emphasize certain tissue or disease characteristics. Different tissues have associated different parameters (i.e spin density, T_1 , T_2 ,...) which are directly related to its signal intensity in the image, thus being a potential source of contrast between different organs. Moreover, they are also sensitive to identify disease state and disease progress.

Imaging the chest is a challenging task because of its constant motion produced by both heart pulsation and respiratory movement. Conventional proton MRI of the lungs is even more problematic due to the low tissue density of approximately 20-30% (1) and to the air-tissue interface susceptibility resulting in a very short T_2 and reduction in the signal strength. Therefore, the healthy lung parenchyma usually shows extremely low signal intensity on conventional MR images. Moreover, the signal from the lung varies depending on the pulmonary disease (2); some are characterized by a higher proton density (eg. oedema) while others result in an even lower signal intensity than healthy lungs (eg. emphysema).

Motion from the heart and the lungs can degrade the quality of the images by blurring and by producing artefacts. Part of these problems can be minimized by synchronizing the image acquisition to the biological motions. However, in small animal experimentation, the cardiac and respiratory rates are rather high (300-500 beats/min and 50-70 breaths/min for rats, respectively) (3). Moreover, the inspiratory volume changes during spontaneous breathing. The use of a ventilation system in MRI experiments can alleviate in part these problems, by

controlling consistently the lung volume and the breathing rate during the data acquisition. The ventilator also permits to choose and define the phase of the respiratory cycle when the MRI acquisition takes place.

A relatively new technique to image the lungs is the application of the MR principles to gases. The fundamental difference between conventional proton and gas MRI is that the spins of interest (resonant species) are in complementary departments. That is, the proton signal is from the lung tissue whereas the gas signal is from the airspaces. Gases MRI technique is basically divided into two main areas depending on the type of polarization of the utilized gas: hyperpolarized noble gases and fluorinated gases.

3.1 Hyperpolarized gases

Hyperpolarized noble gases that diffuse through the airspaces of the lung are used as signal source in MRI.

In thermal equilibrium, the net excess of spins in the lower energy state is on the order of one in a million at typical clinical field strength of 1.5 T (**Figure 3.1 a**)). Since the density of the gases in the lung is low, this excess of spins produces too low signal to be detectable. To solve this problem, the amount of net magnetization of these gases is artificially increased and generated external to the static magnetic field of the MR scanner using a laser-based optical-pumping apparatus. Polarization levels of ~50% reached with laser-optical pumping techniques can enhance the signal by up to a factor of 10^5 which is more than sufficient to overcome the density deficit that gases suffer compared to tissue (**4**). Indeed, high polarization levels can provide sufficient signal even if the HP-gas constitutes only a fraction of the inhaled gas mixture. The two most utilized HP-gases in MRI are ^3He and ^{129}Xe .

The optical pumping (OP) process consists of angular momentum transfer from circularly polarized light to the electron and nuclear spins of atoms (**Figure 3.1 b**)). There are two basic schemes for this transfer: spin-exchange optical pumping (SEOP) and metastability-exchange optical pumping (MEOP). SEOP method is an indirect transfer of the angular momentum from a laser source to any nonzero-spin noble gas using an alkali-metal such as rubidium. SEOP can be done over a broad range of pressures, up to ~ 10 bars. MEOP is the direct

method to transfer the angular momentum to exclusively ^3He nuclei via a radio frequency discharge. This method is much faster than SEOP but it can only be done at a relatively low gas pressure (~ 0.01 bar). MEOP lends itself to both small-scale and large-scale production units, and can potentially reach higher polarization levels allowing for long-range transportation of the gas. A detailed explanation of MEOP and SEOP is beyond the scope of this introductory chapter, however, a thorough description can be found in reviews and original articles in the literature (5-11).

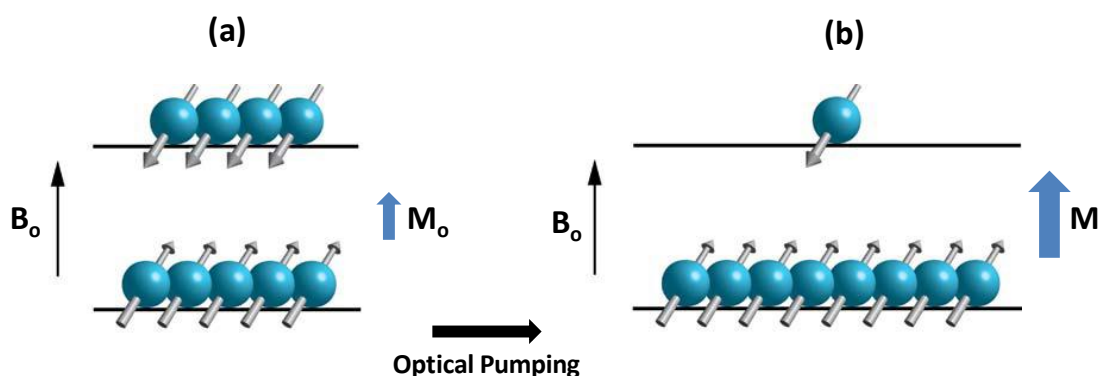


Figure 3.1

Effect of laser-polarization of an ensemble of spin-1/2 nuclei in comparison with the Boltzmann distribution. The orientation of the spin depends on the magnetic moment. a) Thermal equilibrium: the number of spins aligned anti-parallel to the magnetic field is nearly equal to the number of spins aligned parallel (lower energy state), resulting in a small polarization. b) Optical pumping: the population distribution of the spins is driven away from equilibrium, thereby increasing the polarization. Adapted from (12).

Helium is an inert mono-atomic noble gas whose most naturally abundant isotope is ^4He . Only two of the eight isotopes of helium are stable non-radioactive: ^4He and ^3He . Whereas ^4He has a zero nuclear spin, ^3He has a nuclear spin of $\frac{1}{2}$, making the latter sensitive to MR techniques. However, ^3He is a very rare isotope produced from beta decay of tritium. Xenon is an inert mono-atomic noble gas whose most naturally abundant isotopes are ^{132}Xe (26.9%, zero nuclear spin) and ^{129}Xe (26.4%, spin=1/2). ^{129}Xe is a general anesthetic in high concentrations ($>70\%$). Xenon is soluble in blood and tissue which presents advantages in some applications as perfusion imaging. The two different phases of ^{129}Xe (gas and

dissolved) lead to a chemical shift which can be measured by spectroscopy. **Table 3.1** summarizes some important physical and chemical properties of these gases.

Parameter	^3He	^{129}Xe
Atomic number	2	54
Molecular weight (g/mol)	3.016	131.296
Density at 21°C (air=1)	0.1	4.5
Nuclear spin	1/2	1/2
Gyromagnetic ratio, γ (MHz/T)	32.4	11.8
Blood solubility (%) (water=100)	1	17
Natural abundance (%)	1.34×10^{-4}	26.4
Self-diffusion coefficient, D_0 (cm^2/s)	2.05 (13)/1.8 (14)	0.061 (13)
Diffusion coefficient in air (79% N_2 /21% O_2) (cm^2/s) at 310 K and 1 atm	0.86 (13)	0.14 (13)
Typical polarization level in imaging (%)	35-60 (7, 15, 16)	8-20 (17)

Table 3.1

Physical and chemical properties of ^3He and ^{129}Xe .

The magnetization generated by OP is non-recoverable, therefore the application of radiofrequency pulses destroy the signal irreversibly. For this reason, low field systems are the most suited for hyperpolarized gas imaging. The HP gas depolarization is dominated by RF saturation and the paramagnetic effects of residual oxygen in the lung (18). Thus, T_1 decay of ^3He and ^{129}Xe in mixture containing 20% of oxygen is on the order of 10-15 seconds at 1.5-3 T of field strength (19). **Table 3.2** summarizes T_1 , T_2 and T_2^* of He and Xe measured from various authors at different field strengths.

Nucleus	Field strength (T)	T_1 (s)	T_2 (s)	T_2^* (ms)
^3He	1.5-2	32 (20) ^a	2-3 (21) ^b	20 (22) ^a
^3He	0.1	44 (23) ^a	8-10 (23) ^a	>40 (23) ^a
^{129}Xe (gas)	2-4.7	~ 30 (24) ^b	0.31 (25) ^b	18.5 (26) ^b

Table 3.2

Measured T_1 and T_2 relaxation time constants in lung. ^a Values reported for human lungs.

^b Values reported for mouse, rat and Guinea pig lungs. Adapted from (27).

The principal applications of HP-gases MRI include ventilation (spin density) imaging, dynamic imaging of inhalation/exhalation and diffusion weighting imaging (DWI). Most of the ventilation imaging applications are based on 2D multislice techniques, although 3D acquisition methods have been developed in the last years (26, 28-30). Fast MRI acquisitions

for dynamic imaging typically employ non-Cartesian k-space trajectories (radial and spiral) (31, 32). The paramagnetic effect of oxygen is used to study the concentration of alveolar PO_2 which is proportional to the loss of HP-gas polarization over time (18, 33-35). Moreover, DWI is used to measure the physical diffusion coefficient of the HP-gas within the lung airspaces. In regions such as trachea, gas diffusion is largely unrestricted, but in the lung parenchyma, the gas is confined in small structures (alveoli and terminal bronchioles) and thus diffusion is highly restricted. Diffusion measurements with HP-gas MRI have been performed in both humans (36, 37) and animals (38, 39).

3.2 Fluorinated gases

Fluorine MRI of the lung is another approach and its potential has been discussed since the beginning of its application in lung imaging. The signal in fluorinated gases MRI comes from thermal equilibrium polarization. Despite the low signal intensity of these gases, they have clear advantages over HP gases MRI. The cost per liter is drastically reduced and the experimental setup is less complex. Moreover, fluorinated gases can be mixed with oxygen allowing continuous breathing experiments while causing only a small reduction in the spin density and corresponding signal intensity (40).

The fluorine-19 isotope has a 100% natural abundance. The gyromagnetic ratio γ of ^{19}F (40.05 MHz/T) induces that fluorine resonates at a frequency of 188 MHz (200 MHz for proton) at a magnetic field of 4.7T. The most utilized fluorinated gases as exogenous contrast agents are SF_6 , C_2F_6 and CF_4 , which can be directly detected and quantified by ^{19}F MR. There are almost no endogenous fluorine spins in the body that could interfere with the gas signal. The fluorinated gases are chemically inert and have significantly higher molecular weight compared to respiratory gases. Moreover, they demonstrate no toxic effects and are insoluble in water. All these gases contain multiple ^{19}F atoms which are chemically and magnetically equivalent. This fact has a positive effect on the signal to noise ratio (SNR), since the signal per mol of gas is proportional to the number of fluorine atoms in the molecule.

In general, SNR is a problem in fluorinated gases experiments which can be partially solved by averaging. The short relaxation times of fluorinated gases (see [Table 3.3](#)) allow for averaging while keeping the total acquisition time within acceptable limits for in vivo use.

Different functional parameters have been studied with fluorinated gases. SF₆ was used to obtain, for instance, ventilation/perfusion ratios [\(41\)](#), regional oxygen partial pressure and lung volume [\(42\)](#). Dynamic images have been also acquired with this gas [\(43\)](#) as well as some diffusion-weighted images in rat lungs [\(44, 45\)](#). Wolf *et al.* acquired images using scanning times lower than 1 second with both SF₆ and C₂F₆ [\(46\)](#). They also obtained images with an acceptable SNR at a relatively low receiver bandwidth (488Hz/pixel) which permitted to keep the specific absorption rate (SAR) within the legal limits for human studies. Chang *et al.* calculated the T₁ and T₂ of C₂F₆/O₂ and C₃F₈/O₂ mixtures at different gases concentrations [\(47\)](#). Moreover, a model developed by Kuethe and co-workers permits to calculate the T₁ for SF₆, C₂F₆ and CF₄ at a given pressure, temperature and mixture composition for common laboratory conditions with an accuracy of 0.5% [\(48\)](#).

Differences in ADC between explanted healthy donor lungs and explanted severely emphysematous lungs using C₂F₆ [\(40, 49\)](#) as well as C₃F₈ [\(49\)](#) have been shown. The combination of high molecular weights and short relaxation times makes diffusion experiments and in particular ADC measurements of fluorinated gases challenging and also demanding in terms of gradient power.

Some important parameters of the two fluorinated gases most utilized in MRI are summarized in [Table 3.3](#):

Parameter	SF ₆	C ₂ F ₆
Molecular weight (g/mol)	146.06	138.02
Density at 21°C (air=1)	5.113	4.773
T ₁ ≈T ₂ (ms)	1.8 (50)	10 (40)
T ₁ -T ₂ (20% O ₂ - lung) (ms)	1.24 @ 1.9T (41)	5.9/5.3 @ 1.9T (51) - 8.8 @ 1.5T (40)
Number of fluorine atoms	6	6
Free diffusion coefficient (cm ² /s)	0.0328 @ 4.7T, 293 K, 1 atm (45)	0.033 @ 1.5T, 300 K, 1 atm (40)

Table 3.3

Summary of some important parameters for MRI of SF₆ and C₂F₆

3.3 Diffusion

In conditions of thermodynamic equilibrium, in which random thermal movement is the only source of molecular movement, the distribution (Gaussian) of particle displacement during any given interval time t has zero mean (all directions are equiprobable) and variance related to the diffusion length given by the Einstein–Smoluchowski relation:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad \text{Eq. 3.1}$$

The mean square displacement $\langle x^2 \rangle$ gives the path that the particle travels during a certain time in freely condition. However, generally molecules are confined in structures restricting diffusion. There are two different regimes depending on the time used to measure the diffusion. Short time measurements do not allow the particles to collide extensively with the walls that limit the movement whereas for a long time limit, all particles suffer the restriction. **Figure 3.2** shows the movement of a single particle diffusing in free and spherical restricted conditions for short and long diffusion times. Different sizes of the structures vary the degree of restriction in diffusion measurements, thus for a certain diffusion time the greater the structures the less restricted movement of the molecules (**Figure 3.3**).

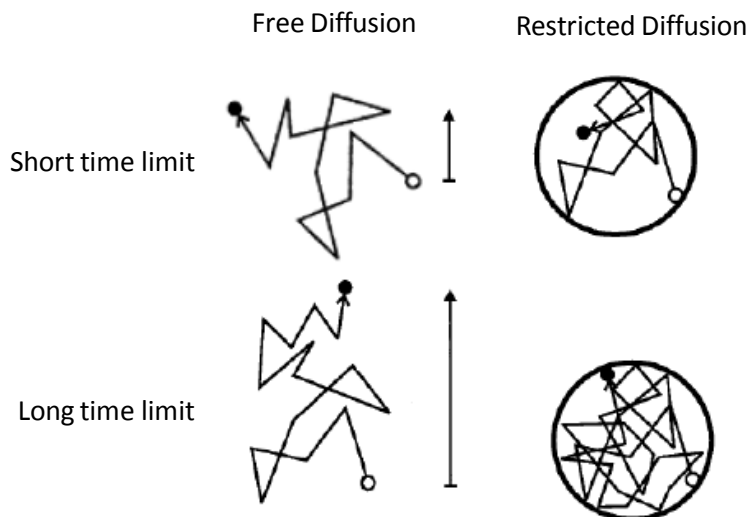


Figure 3.2

Freely and spherically restricted diffusion of a particle measured at different time regimes. The empty circle represents the position of the particle in the beginning of the measurement and the full one at the end. The length of the arrows represents the mean square displacement of the particle in one direction. Adapted from (52).

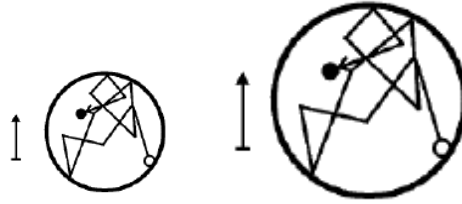


Figure 3.3

Comparison of the movement restriction in different structures sizes where the gas is confined. The length of the arrows represents the mean square displacement of the particle in one direction. Larger structures restrict less the diffusion of the molecules.

In the particular case of a sphere the molecules are equally restricted in all the possible directions. However, any structure with any other shape will show a different restriction of the diffusion depending on the direction of the measurement. **Figure 3.4** shows the particular case of a cylinder.

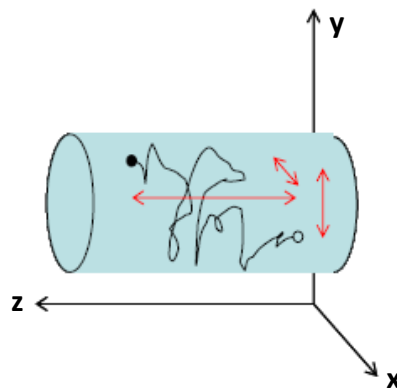


Figure 3.4

Particle diffusing inside a cylinder. The empty circle represents the initial position of the particle and the full one the final position. The red arrows show the mean square displacement along the three main axes. Adapted from (52).

In a mixture containing several gases, the microscopic mobility of each species is in principle different, and a diffusion coefficient can be defined for each of them. These coefficients, accounting separately for the mobility of each species, are called intra-diffusion coefficients. They in principle depend on the concentration of each component in the mixture. On the other hand, the inter-diffusion coefficient accounts for the mixing of any pair of components in the mixture which would depend on the mobility of both of these components.

Diffusion MRI measures intra-diffusion, since the only signal received comes from the resonant species. Fortunately the intra-diffusion coefficient of any component i of a mixture of N components is easily calculated using the relation:

$$\frac{1}{D_i^*} = \frac{\chi_i}{D_{ii}} + \sum_{j \neq i} \frac{\chi_j}{D_{ij}} \quad \text{Eq. 3.2}$$

where the subscript i denotes the species of interest and j the other species in the mixture. Thus, D_i^* is the intra-diffusion coefficient of the species of interest, D_{ii} is its self-diffusion coefficient, D_{ij} are the binary inter-diffusion coefficients of all other species with respect to the one of interest, and χ_i, χ_j are the molar concentrations of the components.

Binary inter-diffusion coefficients and the self-diffusion coefficient ($i = j$) can all be computed theoretically using the relation given by Hirschfelder *et al.* (53), based on the Lennard-Jones potential (54). The diffusion coefficient of a binary gas mixture, AB, in a first approximation (marked with the superscript ¹) is represented by the equation:

$$[D_{AB}]^1 = 0.0026280 \frac{\sqrt{T^3 (M_A + M_B)}}{p \sigma_{AB}^2 \Omega_{AB}^1 K T \sqrt{2 M_A M_B}} \epsilon_{AB} \quad \text{Eq. 3.3}$$

where D_{AB} is the diffusion coefficient in cm^2/s , M_A and M_B are the molecular weights of the species A and B, σ_{AB} is the characteristic length, ϵ_{AB} is the characteristic potential energy parameter, Ω_{AB} is the collision integral for diffusion dependent on the temperature and the intermolecular force law, p is the pressure (atm), T is the temperature (K) and K is the Boltzmann constant. σ_{AB} and ϵ_{AB} are given by:

$$\sigma_{AB} = \frac{1}{2}(\sigma_A + \sigma_B) \quad \text{Eq. 3.4}$$

$$\epsilon_{AB} = \sqrt{\epsilon_A \epsilon_B} \quad \text{Eq. 3.5}$$

Hirschfelder listed the diffusion coefficient for different pairs of gases which were theoretically calculated and experimentally observed (53).

3.4 Measurement of diffusion by MR

The diffusion of a gas can be measured in MR by diffusion weighted imaging (DWI). The Brownian motion of nuclei in magnetic field gradients generally leads to MR signal depletion, which is dependent on the diffusion coefficient and the details of the gradient switching. In diffusion-weighted imaging instead of a homogeneous magnetic field, the homogeneity is varied linearly by a pulsed field gradient. Since precession is proportional to the magnetic field strength, the spins begin to precess at different rates, resulting in dispersion of the phase and signal loss. Another gradient pulse is applied in the same direction but with opposite magnitude to refocus or rephase the spins. The refocusing will not be perfect for those spins that have diffused during the time interval between the pulses, and therefore the echo is attenuated and the signal measured by the MR scanner is reduced.

The diffusion weighting is performed by applying bipolar diffusion sensitizing gradients (BDSG) which in our particular case are sinusoidal and given by:

$$G(t) = G_0 \sin\left(\frac{2\pi t}{T_d}\right) \quad \text{Eq. 3.6}$$

where G_0 is the strength of the gradients and T_d the total diffusion time ($T_d = 2t_d + \Delta t_d$). The chronogram of a sequence with sinusoidal BDSG is shown in Figure 3.5.

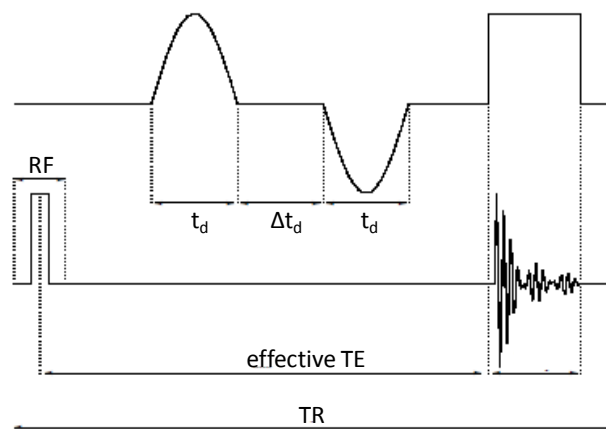


Figure 3.5

Pulse sequence scheme showing the sinusoidal BDSG. Adapted from (55).

In a free gas, the random nature of Brownian displacements leads to a Gaussian distribution of phases. The signal intensity decays exponentially with the gas diffusion coefficient D as sensitivity to motion is increased by application of stronger gradients. This reduction in signal is given by the equation:

$$S = S_0 e^{-D \cdot b} \quad \text{Eq. 3.7}$$

where S_0 is the signal intensity without diffusion weighting, S is the signal intensity with diffusion gradient, D is the diffusion coefficient and b is the so-called b -value which describes the degree of diffusion weighting. The timings of the images with and without BDSG are held the same, so that the only difference between the images is the diffusion weighting.

The b -values are calculated using the following equation:

$$b = \frac{\gamma^2 G^2 t_d^2}{\pi^2} (4T_d - 5t_d) \quad \text{Eq. 3.8}$$

where γ is the gyromagnetic ratio.

In the particular case that both lobes are applied consecutively without a gap between them ($t_d = T_d/2$) equation 3.8 is reduced to:

$$b = \frac{3\gamma^2 G^2 T_d^3}{8\pi^2} \quad \text{Eq. 3.9}$$

The values of the gradient strength are taken equidistantly from the minimum to the maximum value depending on the number of diffusion weighted images. These values are introduced in Eq. 3.9 together with the total diffusion time to calculate the b -values.

In pulmonary structures the diffusion of gases is restricted, thus Eq. 3.7 is not longer used and Eq. 3.10 is used instead:

$$S = S_0 e^{-ADC \cdot b} \quad \text{Eq. 3.10}$$

where ADC is the apparent diffusion coefficient. This parameter depends not only on the diffusion movement of the particles but also on the geometry and size of the structure in which the gas is confined. ADC measurements have been widely performed in both humans and animals confirming that ADC is sensitive to changes in lung microstructure.

3.5 Acquisition of diffusion weighted images with HP-gases: ComSpiRa sequence

There are several factors which must be taken into account when performing diffusion weighted imaging with hyperpolarized gases. Since HP^3He spin magnetization is not renewable, the polarization of the gas must be preserved as much as possible, thus rf π -pulses sequences should be avoided and acquisition of FIDs (free induction decay) or echoes obtained from gradient-echo sequences are preferable. Moreover, the effect of motion is a special concern in lung imaging, hence non-Cartesian encoding schemes present advantages over Cartesian acquisitions due to oversampling the center of the k-space. ComSpiRa (COMbined SPIral and RAdial) is the name given to a pulse sequence which combines radial and spiral acquisition by using a mathematical equation (56).

A sequential acquisition order in radial projection images is shown in Figure 3.6 (a), where n_r is the total number of radial trajectories and $2\pi/n_r$ is the angle between two consecutively acquired lines. However, to homogeneously distribute the effect of the depolarization of the HP-gas over an image, the radial trajectories are taken in a non-sequential order (Figure 3.6 (b)). This figure shows the order of the trajectories for the particular case of $n_r=200$ and a phase stepping factor of 49. The phase stepping factor is proportional to the angular difference between two consecutive readout encoding steps, that is, it determines the number of radii in between the two acquired consecutively.

An interleaved scheme was chosen for diffusion weighting imaging in order to average both artifacts from motion and signal loss due to helium depolarization over time. Thus, the BDSG were applied within the phase step loop. In other words, the same k-space trajectory is acquired for all b-values before acquiring the next one. Figure 3.7 shows the order of the radials acquisition in the four DWI.

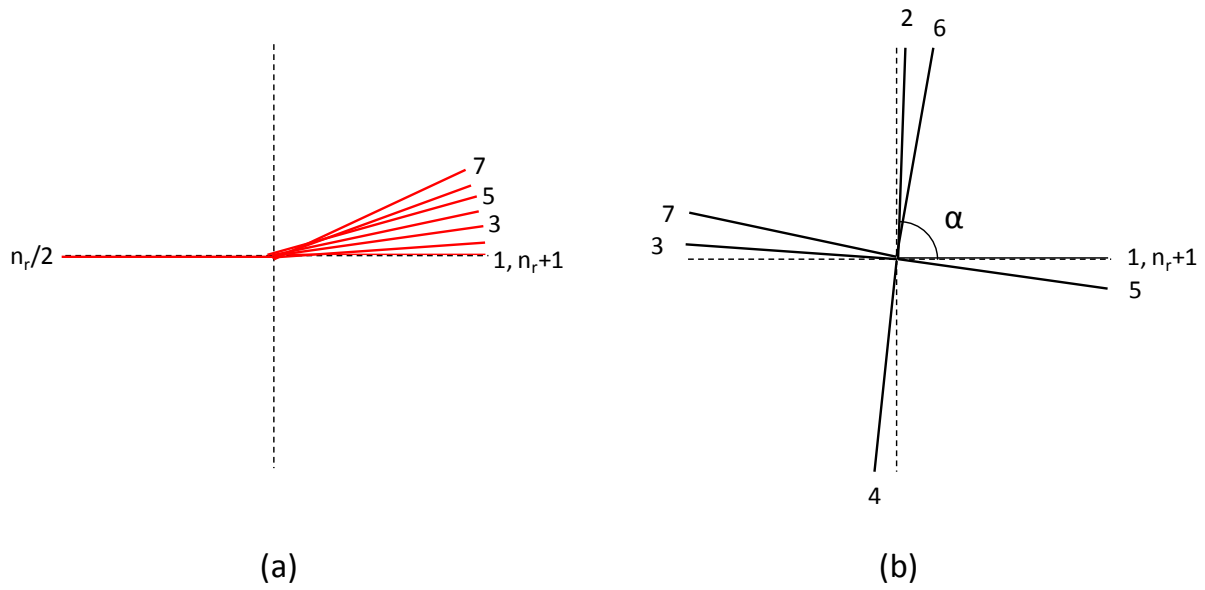


Figure 3.6

Scheme of a sequential (a) and a non-sequential (b) acquisition order of radial trajectories in an image. In both schemes, the first line to be acquired is 1 and the order increases one by one up to the last line (n_r).

α denotes the angle between two lines acquired consecutively in non-sequential order scheme. This angle depends on the number of trajectories and the phase stepping factor ($\alpha = 2\pi/n_r \cdot \text{phase stepping factor}$)

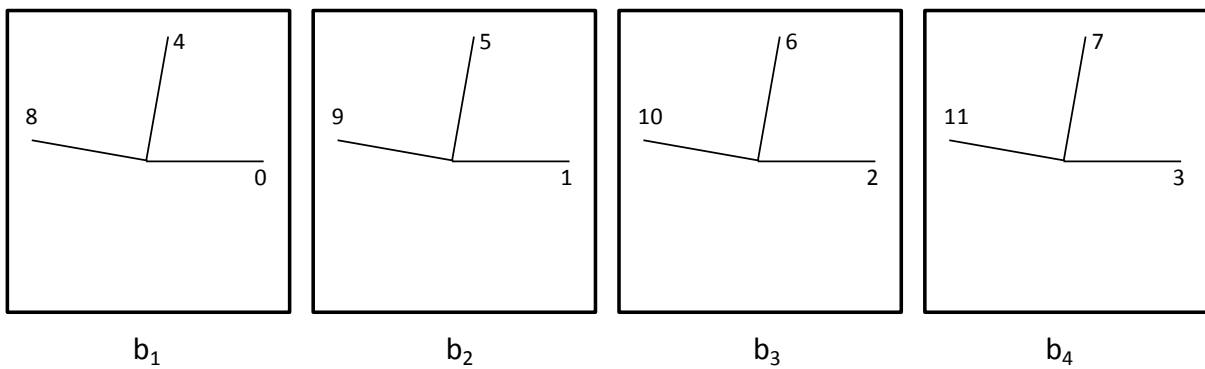


Figure 3.7

Scheme of the non-sequential acquisition order of a set of four DW images obtained with radial trajectories.

References

1. Harris P, Heath D. The human pulmonary circulation. Churchill Livingstone: Edinburgh; 1986.
2. Baert AL, Knauth M, Sartor K. MRI of the lung. Springer; 2009.
3. Hedlund LW, Johnson GA. Morphology of the Small-Animal Lung Using Magnetic Resonance Microscopy. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(6):481-483.
4. Driehuys B, Hedlund LW. Imaging techniques for small animal models of pulmonary disease: MR microscopy. *Toxicol Pathol* 2007;35(1):49-58.
5. Moller HE, Chen XJ, Saam B, Hagspiel KD, Johnson GA, Altes TA, de Lange EE, Kauczor HU. MRI of the lungs using hyperpolarized noble gases. *Magn Reson Med* 2002;47(6):1029-1051.
6. Appelt S, Ben-Amar Baranga A, Erickson CJ, Romalis MV, Young AR, Happer W. Theory of spin-exchange optical pumping of ^3He and ^{129}Xe . The American Physical Society 1998.
7. Becker J, Heil W, Krug B, Leduc M, Meyerhoff M, Nacher PJ, Otten EW, Prokscha T, Schearer LD, Surkau R. Study of mechanical compression of spin-polarized ^3He gas. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 1994;346(1-2):45-51.
8. Becker J, Bermuth J, Ebert M, Grossmann T, Heil W, Hofmann D, Humblot H, Leduc M, Otten EW, Rohe D, Surkau R. Interdisciplinary experiments with polarized ^3He . *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 1998;402(2-3):327-336.
9. Colegrove FD, Schearer LD, Walters GK. Polarization of ^3He gas by optical pumping. *Phys Rev* 1963;132:2561-2572.
10. Happer W. Optical pumping. *Rev Mod Phys* 1972;44:169-249.
11. Walker T.G., Happer W. Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. *Rev Mod Phys* 1997;69:629-642.
12. Mansson S, Johansson E, Magnusson P, Chai CM, Hansson G, Petersson JS, Stahlberg F, Golman K. ^{13}C imaging-a new diagnostic platform. *Eur Radiol* 2006;16:57-67.
13. Chen XJ, Moller HE, Chawla MS, Cofer GP, Driehuys B, Hedlund LW, Johnson GA. Spatially resolved measurements of hyperpolarized gas properties in the lung in vivo. Part I: diffusion coefficient. *Magn Reson Med* 1999;42(4):721-728.
14. Bock M. Simultaneous T_2^* and diffusion measurements with ^3He . *Magn Reson Med* 1997;38(6):890-895.
15. Altes TA, Mata J, de Lange EE, Brookeman JR, Mugler JP, III. Assessment of lung development using hyperpolarized helium-3 diffusion MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2006;24(6):1277-1283.

16. Otten E. Take a breath of polarized noble gas. *Europhysics News* 2004;35:16-20.
17. Ruppert K, Mata JF, Brookeman JR, Hagspiel KD, Mugler JP, III. Exploring lung function with hyperpolarized Xe-129 nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Med* 2004;51:676-687.
18. Deninger AJ, Eberle B, Ebert M, Grossmann T, Heil W, Kauczor H, Lauer L, Markstaller K, Otten E, Schmiedeskamp J, Schreiber W, Surkau R, Thelen M, Weiler N. Quantification of regional intrapulmonary oxygen partial pressure evolution during apnea by (3)He MRI. *J Magn Reson* 1999;141(2):207-216.
19. Saam B, Happer W, Middleton H. Nuclear relaxation of 3He in the presence of O2. *Phys Rev A* 1995;52(1):862-865.
20. Kauczor H, Surkau R, Roberts T. MRI using hyperpolarized noble gases. *Eur Radiol* 1998;8(5):820-827.
21. Kober F, Koenigsberg B, Belle V. NMR imaging of thermally polarized helium-3 gas. *J Magn Reson* 1999;138:308-312.
22. Saam B, Yablonskiy DA, Gierada DS, Conradi MS. Rapid imaging of hyperpolarized gas using EPI. *Magn Reson Med* 1999;42:507-514.
23. Durand E, Guillot G, Darrasse L, Tastevin G, Nacher PJ, Vignaud A, Vattolo D, Bittoun J. CPMG measurements and ultrafast imaging in human lungs with hyperpolarized helium-3 at low field (0.1 T). *Magn Reson Med* 2002;47:75-81.
24. Albert MS, Cates GD, Driehuys B, Happer W, Saam B, Springer CS, Jr., Wishnia A. Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized 129Xe. *Nature* 1994;370(6486):199-201.
25. Zhao, L, Mulkern, R, Venkatesh, A, Gudbjartsson, H., Jolesz, F, and Albert, M. Hyperpolarized 129Xe T2 and diffusion measurements for fast spin-echo MRI [abstract]. In: Anonymous. 1998.
26. Chen XJ, Moller HE, Chawla MS, Cofer GP, Driehuys B, Hedlund LW, MacFall JR, Johnson GA. Spatially resolved measurements of hyperpolarized gas properties in the lung in vivo. Part II: T*(2). *Magn Reson Med* 1999;42(4):729-737.
27. Fain SB, Korosec FR, Holmes JH, O'Halloran R, Sorkness RL, Grist TM. Functional lung imaging using hyperpolarized gas MRI. *J Magn Reson Imaging* 2007;25(5):910-923.
28. Dugas JP, Garbow JR, Kobayashi DK, Conradi MS. Hyperpolarized (3)He MRI of mouse lung. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1310-1317.
29. Eberle B, Markstaller K, Schreiber WG, Kauczor HU. Hyperpolarised gases in magnetic resonance: a new tool for functional imaging of the lung. *Swiss Med Wkly* 2001;131(35-36):503-509.
30. Wild JM, Woodhouse N, Paley M, FICHELE S, Said Z, Kasuboski L, van Beek EJ. Comparison between 2D and 3D gradient-echo sequences for MRI of human lung ventilation with hyperpolarized 3He. *Magn Reson Med* 2004;52:673-678.
31. Salerno M, Altes TA, Brookeman JR, de Lange EE, Mugler JP, III. Dynamic spiral MRI of pulmonary gas flow using hyperpolarized (3)He: preliminary studies in healthy and diseased lungs. *Magn Reson Med* 2001;46(4):667-677.

32. Wild JM, Paley MN, Kasuboski L, Swift A, FICHELE S, Woodhouse N, Griffiths PD, van Beek EJ. Dynamic radial projection MRI of inhaled hyperpolarized ^3He gas. *Magn Reson Med* 2003;49(6):991-997.
33. Fischer MC, Spector ZZ, Ishii M, Yu J, Emami K, Itkin M, Rizi R. Single-acquisition sequence for the measurement of oxygen partial pressure by hyperpolarized gas MRI. *Magn Reson Med* 2004;52(4):766-773.
34. Fischer MC, Kadlecsek S, Yu J, Ishii M, Emami K, Vahdat V, Lipson DA, Rizi RR. Measurements of regional alveolar oxygen pressure using hyperpolarized ^3He MRI. *Acad Radiol* 2005;12(11):1430-1439.
35. Rizi RR, Baumgardner JE, Ishii M, Spector ZZ, Edvinsson JM, Jalali A, Yu J, Itkin M, Lipson DA, Geftter W. Determination of regional VA/Q by hyperpolarized ^3He MRI. *Magn Reson Med* 2004;52(1):65-72.
36. Salerno M, de Lange EE, Altes TA, Truwit JD, Brookeman JR, Mugler JP, III. Emphysema: hyperpolarized helium 3 diffusion MR imaging of the lungs compared with spirometric indexes--initial experience. *Radiology* 2002;222(1):252-260.
37. Saam BT, Yablonskiy DA, Kodibagkar VD, Leawoods JC, Gierada DS, Cooper JD, Lefrak SS, Conradi MS. MR imaging of diffusion of (^3He) gas in healthy and diseased lungs. *Magn Reson Med* 2000;44(2):174-179.
38. Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J, Cremillieux Y, Rodriguez I, Dupuich D, Callot V, Ortega M, Rubio Arbo ML, Cortijo M, Gonzalez-Mangado N. Helium-3 MRI diffusion coefficient: correlation to morphometry in a model of mild emphysema. *Eur Respir J* 2003;22(1):14-19.
39. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of ^3He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
40. Jacob RE, Chang YV, Choong CK, Bierhals A, Zheng HD, Zheng J, Yablonskiy DA, Woods JC, Gierada DS, Conradi MS. ^{19}F MR imaging of ventilation and diffusion in excised lungs. *Magn Reson Med* 2005;54(3):577-585.
41. Kueth DO, Caprihan A, Gach HM, Lowe IJ, Fukushima E. Imaging obstructed ventilation with NMR using inert fluorinated gases. *J Appl Physiol* 2000;88(6):2279-2286.
42. Kueth DO, Behr VC, Begay S. Volume of rat lungs measured throughout the respiratory cycle using ^{19}F NMR of the inert gas SF_6 . *Magn Reson Med* 2002;48(3):547-549.
43. Schreiber WG, Eberle B, Laukemper-Ostendorf S, Markstaller K, Weiler N, Scholz A, Burger K, Heussel CP, Thelen M, Kauczor HU. Dynamic (^{19}F)-MRI of pulmonary ventilation using sulfur hexafluoride (SF_6) gas. *Magn Reson Med* 2001;45(4):605-613.
44. Perez-Sanchez JM, Perez de AR, Rodriguez I, Cortijo M, Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J. In vivo diffusion weighted ^{19}F MRI using SF_6 . *Magn Reson Med* 2005;54(2):460-463.
45. Ruiz-Cabello J, Perez-Sanchez JM, Perez de AR, Rodriguez I, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G, Cortijo M. Diffusion-weighted ^{19}F -MRI of lung periphery: Influence of pressure and air- SF_6 composition on apparent diffusion coefficients. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;148(1-2):43-56.

46. Wolf U, Scholz A, Heussel CP, Markstaller K, Schreiber WG. Subsecond fluorine-19 MRI of the lung. *Magn Reson Med* 2006;55(4):948-951.
47. Chang YV, Conradi MS. Relaxation and diffusion of perfluorocarbon gas mixtures with oxygen for lung MRI. *J Magn Reson* 2006;181(2):191-198.
48. Kuethe DO, Pietrass T, Behr VC. Inert fluorinated gas T1 calculator. *J Magn Reson* 2005;177(2):212-220.
49. Conradi MS, Saam BT, Yablonskiy DA, Woods JC. Hyperpolarized ³He and perfluorocarbon gas diffusion MRI of lungs. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2006;48:63-83.
50. Courtney JA, Armstrong RL. A nuclear spin relaxation study of the spin-rotation interaction in spherical top molecules. *Can J Phys* 1972;50:1252-1261.
51. Kuethe DO, Caprihan A, Fukushima E, Waggoner RA. Imaging lungs using inert fluorinated gases. *Magn Reson Med* 1998;39(1):85-88.
52. Agulles-Pedros L. Influence of Diffusion on Contrast and Sensitivity in MRI of Gases [dissertation]. 2004.
53. HIRSCHFELDER JO, Curtis CF, BIRD RB. Molecular theory of gases and liquids. Wiley, New York; 1954.
54. Lennard-Jones JE. Cohesion. *Proceedings of the Physical Society* 1931;43:461-483.
55. Perez-Sanchez JM. La imagen de resonancia magnética de difusión de gases como herramienta de caracterización de la estructura y la función pulmonar [dissertation]. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
56. Rodriguez I, Perez de AR, Cortijo M, Ruiz-Cabello J. COMSPIRA: A common approach to spiral and radial MRI. *Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering)* 2004;20B:40-44.

Chapter 4

**Experimental setup and methodology for
HP³He MRI measurements**

**Dispositivo experimental y metodología
para experimentación con HP³He**

Chapter 4

4.1 Setup of the ventilation system and MR scanner

4.2 Animal preparation

4.3 Ventilation protocol

4.4 Imaging protocol

4.5 ADC calculation and statistic analysis

Introduction

In this chapter, the experimental setup used in all helium experiments will be described. The functionality, requirements and restrictions of the most important elements involved will be explained in detail. We note that in this chapter only the hardware of the ventilator-applicator system will be described whereas the software description can be found in the appendix.

Animal handling and animal preparation will be detailed in this chapter since most of the procedure was common for all helium experiments. If necessary, any particularity will be specified in its corresponding section. Each series of experiments has their own specificities regarding the ventilation protocol and ventilation method, therefore only the ventilation settings which all helium experiments have in common will be described herein.

The imaging protocol with the most important imaging parameters of the sequence will be introduced in this chapter. Finally, the definition of the regions of interest, the calculation of ADC values, the generation of ADC maps and the statistic analysis will also be explained in this chapter.

4.1 Setup of the ventilation system and MR scanner

The ventilator-applicator system controls the ventilation of the animals as well as the application of HP^3He . The experimental process is divided in two phases or modes: ventilation and imaging. In the first one, animals are breathing ventilation gas and in the

Figure 4.1 shows a diagram of the entire experimental setup. The elements and their positions are based on physiological and technical requirements. All the elements within the red line in the figure are placed inside the magnet during the image acquisition.

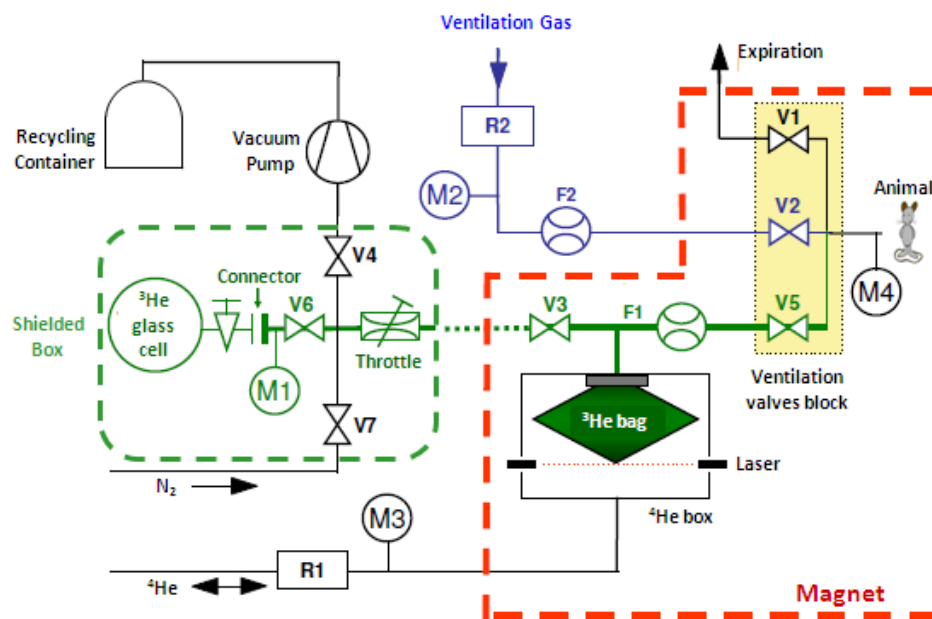


Figure 4.1

Experimental setup of the ventilation system. Adapted from (1).

Dispositivo experimental del sistema de ventilación. Adaptado de (1).

The ventilation valves block (yellow box) is the interface between the animal and the ventilation system. It is connected to the animal through an endo-tracheal tube. This block must be as close to the animal as possible in order to reduce dead volume (2). The block contains three valves serving for inspiration (V2), expiration (V1) and HP^3He application (V5). Between the valves block and the animal there is a manometer (M4) which measures the pressure in the trachea in real-time.

In ventilation mode the system is connected to the ventilation gas source whose pressure is reduced to the physiological range (around a few milibars) through a pressure reducer (R2) and controlled by a manometer (M2). The ventilation gas passes through V2 reaching the animal's lung. Both, the gas flow and the time that V2 is open determine the level of lung

inflation (tidal volume, TV). The expiration occurs when V1 is open while V2 is closed, allowing the animal to breathe out. The expiration phase is considered finished when the time the animal is breathing out is long enough to reduce the pressure to the atmospheric value.

We note that the term tidal volume (TV) is only used when the lung is inflated with the ventilation gas during the ventilation mode, while we will denote end-inspiratory pressure (EI) to the breath-hold pressure when HP³He is applied instead.

For imaging ³He was polarized by using the metastability-exchange method (3, 4) which permitted to reach a polarization level of 69-71%. The polarization was performed in a home-built polarizer at the Physics Department at University of Mainz (Germany). A spherical glass cell is used to content a volume of 1.1 L of HP-gas at a pressure ranging from 2 to 3 bars per liter. In order to keep the polarization of the gas as long as possible, the glass cell has to be transported (5) and stored in a homogeneous magnetic field. Due to the lack of space in the homogeneous area inside the magnet, the glass cell is kept in a shielded box placed outside of the 5G line. A solenoid in the box creates a low homogeneous magnetic field in which the glass cell is stored. All the elements inside the shielded box, i.e. three pneumatic valves (V4, V6 and V7), a throttle which regulates the ³He flow and a pressure sensor (M1) which measures the pressure in the glass cell are represented inside the dash green line in Figure 4.1. A picture of the shielded box with all the elements is shown in Figure 4.2.

V4 controls the vacuum of the system and V7 connects the system with a source of nitrogen used for cleaning part of the lines of the circuit.

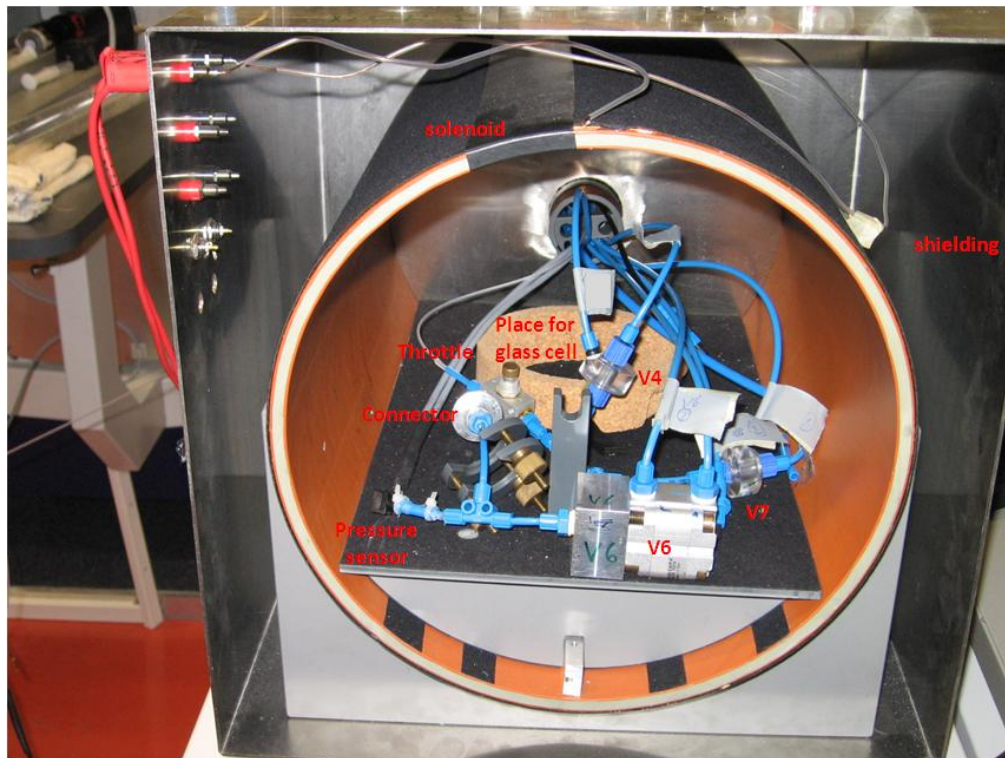


Figure 4.2

Shielded box which is used to store the HP^3He glass cell. Some of the valves of the ventilator can also be seen.

Caja de aislamiento en la que se almacena la célula de HP^3He . Se muestra parte de las válvulas del ventilador.

In imaging experiments the glass cell is connected to the system and the throttle is manually opened to regulate the HP-gas flow. V6 and V3 are electronically opened to release a bolus of HP^3He which flows through a thin capillary from the glass cell to the ^3He bag which is inside of a ^4He Plexiglas box (**Figure 4.3**). The bag is used as a HP-gas reservoir and is placed into the magnet as close to the animal as possible during the measurement. A photoelectric relay crosses the free space between the interior of the box and the bag. In the filling process the bag is inflated until reaching the maximum volume (30-40 ml), at this point the bag cuts the laser and the filling process is automatically interrupted by closing V6 and V3. Once the bag is filled, the space between the bag and the box is filled with ^4He with a constant flow which presses the HP-gas out of the bag to the animal through V5. The end inspiration pressure (EI) is determined by the HP-gas flow and the time V5 remains opened. Once the desired pressure is reached, a breath-hold can be achieved by maintaining V5, V1

and V2 closed. During the process of filling the bag V1 and V2 continue ventilating the animal but they are closed when the process of inflating the lung with ^3He starts. Immediately after the breath-hold, the animal is allowed to continue breathing in (V2) and out (V1) the ventilation gas. Before repeating the process of filling the bag with a fresh bolus of HP-gas, the residual depolarized ^3He is removed from the bag. This is performed by connecting a vacuum pump and opening V3 and V4. The residual gas is sent to and collected in a container for later recycling performed at the Physics Department of Mainz's University. For hygienic issues only the residual gas from the helium bag can be recycled.

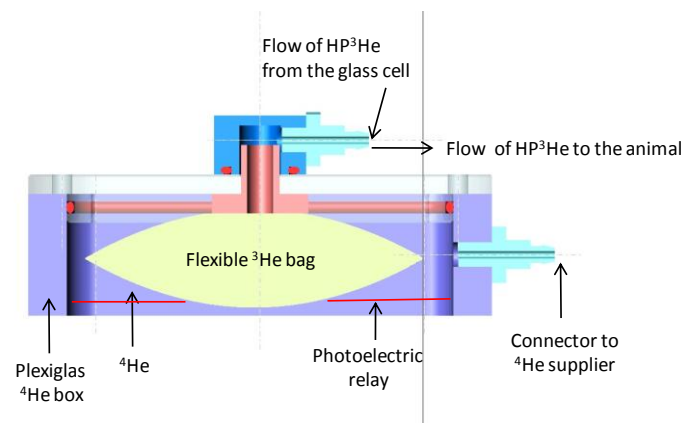


Figure 4.3

Illustration of the HP³He bag and the ⁴He box (Plexiglas)

Ilustración de la bolsa de HP³He y la caja de Plexiglas para ⁴He

4.2 Animal preparation

Animal-handling procedures were approved by the local Ethical Committee.

All animal experiments were performed using adult male Wistar rats. Animals weighted between 240-260 g when being delivered to the laboratory. Depending on the kind of study and the protocol the animal weight at the imaging time point varied from 280 to 450 g.

Animals were instilled either with saline or with porcine pancreatic elastase (Sigma-Aldrich Chemie) dissolved in saline under gaseous anaesthesia with isoflurane. Once the animals had lost the reflex they were placed in a ramp holding from the mouth in order to be intubated with a 12G plastic i.v. catheter (Vygon, Ecouen, France). The intubation procedure was

supported by a PANOVIEW endoscope (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Germany). The catheter was introduced only as far as the bifurcation of the trachea. The administration of the saline or elastase was carried out through the catheter. Two different modalities of instillation were used, whole-lung and mono-lobar treatment depending on the experiment. In the latter case, a thin bended capillary was inserted into the intra-tracheal catheter and guided to reach exclusively the left lung. Then, the elastase could be instilled through this capillary. Saline was not instilled in the right lung of the mono-lobar treated animals.

A volume of saline of 0.4 ml or 0.2 ml was applied for whole-lung and mono-lobar treatment, respectively. Dosage was 20 units of elastase for whole-lung instillation and 25 units for the mono-lobar case.

The time passed between treatment and image acquisition varied from 4 to 8 weeks and it will be specified for each particular experiment.

For imaging, animals were anaesthetized with an intra-peritoneal injection with either thiopental Na or pentobarbital, at a concentration of 6 % and with a dose of 0.1 ml/100 g animal weight (0.06 mg/kg). After the animals lost their toe pinch reflex, they were intubated, the same way as for the instillation, connected to the home-built MR-compatible ventilator-applicator and placed supine in an animal bed into the scanner.

The intra-tracheal pressure of all animals was real-time monitored (manometer M4) during the whole experiment.

4.3 Ventilation protocol

As explained in more detailed in the appendix, the ventilator was time-controlled and therefore neither pressure nor volume was set to any fixed value. However, the pressure could be adjusted to a desired value by controlling the time scheme of the valves involved. The ventilation protocol consisted of periods of inspiration and expiration (60 breaths per minute) at tidal volume (TV), pre-wash cycles and a 10s-breath-hold. The image acquisition took place during the breath-hold. Thus, this scheme was repeated as many times as images were needed to provide as long as the total ventilation time was reasonable for the animals to stand.

The ventilation cycles at TV were performed with the ventilation gas containing 21% of oxygen while the gas using for the pre-washes and the breath-hold did not contain oxygen. The breath-hold was applied at either end inspiration pressure (EI) or at end expiration pressure (corresponding to the end expiration volume, EEV). The latter one was performed by allowing the animal to breathe out until reaching the functional lung capacity (FLC) after a full inspiration (Figure 4.4).

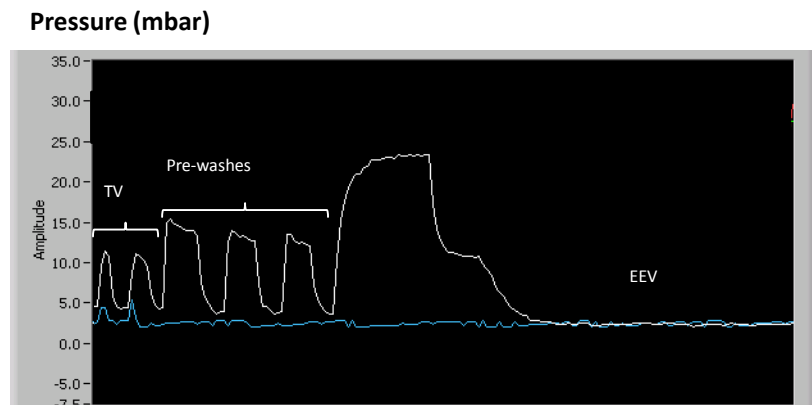


Figure 4.4

Real-time ventilation scheme of a representative animal imaged at EEV. Two ventilation cycles at tidal volume, the three pre-washes, a full inspiration and the breath-hold at EEV can be seen. Note that the base ventilation line is in 5 mbar, meaning that this particular case the animal was ventilated with a positive end expiratory pressure of 5 mbar (PEEP5).

Esquema de ventilación a tiempo real de un animal medido a EEV. Se observan dos ciclos de ventilación a volumen tidal, los tres prelavados, una inspiración completa y la apnea a EEV.

Se ve que la línea base de ventilación está en 5 milibares, significando que en este caso particular el animal se ventiló con una presión positiva de 5 milibares (PEEP5).

Two different end inspiration breath-hold pressures (EI BH) were used (~ 12 and ~ 22 mbar - Figure 4.5). These two values slightly vary from animal to animal due to the differences in individual lung volumes. Prior to the application of the breath-hold some wash cycles (pre-washes) were applied. The number of pre-washes varied from 1 to 3 in one experiment (Chapter 5.2) while in the rest of experiments three washes were applied (as it is seen in both Figure 4.4 and Figure 4.5).

In several experiments a Positive End Expiratory Pressure (PEEP) was applied during the ventilation. This was carried out by connecting a water column with the desired pressure to the expiration tube. In most of the cases we compared the results obtained with no PEEP (PEEP0) and with 5 mbar of pressure (PEEP5). In a separate experiment we varied the PEEP value from 0 to 8 mbar to study its influence on ADC measurements.

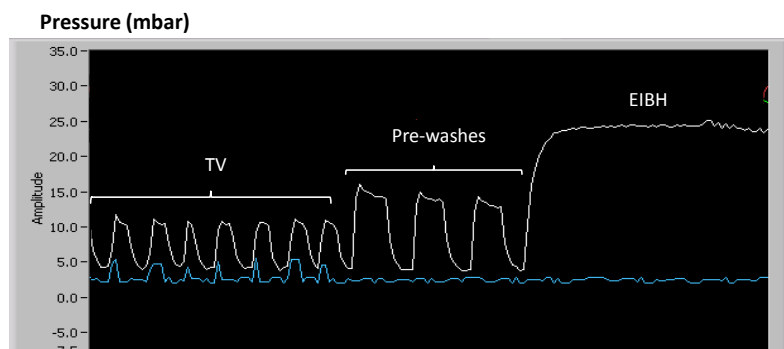


Figure 4.5

Real-time ventilation scheme of a representative animal imaged at El BH (same animal as in Figure 4.5). Several ventilation cycles at tidal volume, the three pre-washes and an end-inspiration breath-hold (~ 23 mbar) can be seen. Animal ventilated with a PEEP of 5 mbar (PEEP5).

Esquema de ventilación a tiempo real del mismo animal que en la Figura 4.5 pero medido a El BH. Se observan varios ciclos de ventilación a volumen tidal, los tres prelavados y la apnea al final de la inspiración (aproximadamente a 23 milibares). El animal se ventiló con un PEEP de 5 milibares.

The effect of the application of 5 mbar of PEEP can be seen in the real-time ventilation scheme (**Figure 4.6**). ΔP indicates the increase of the pressure base line when applying a PEEP.

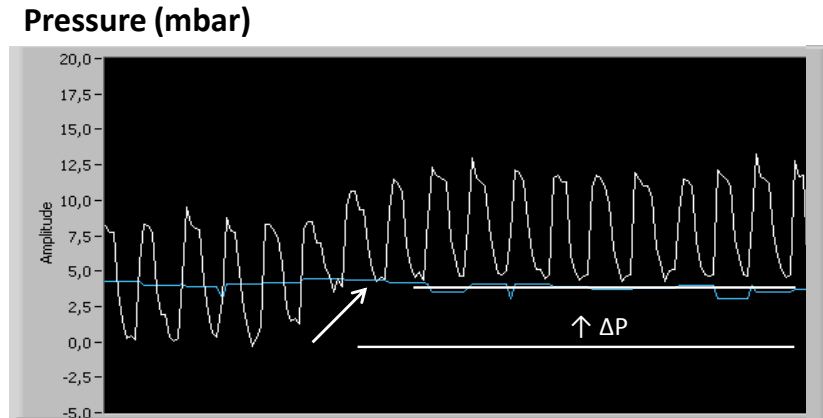


Figure 4.6

Ventilation at tidal volume of a representative animal showing the effect of applying a PEEP. The white arrow indicates the moment at which the water column is connected to the animal ($\Delta P \approx 5$ mbar).

Ventilación a volumen tidal de un animal típico mostrando el efecto al aplicar un PEEP. La flecha blanca indica el momento en el que la columna de agua se conecta al animal ($\Delta P \approx 5$ mbar).

For more details of the software of the ventilator-applicator system and the parameter settings see the appendix.

4.4 Imaging Protocol

Imaging was performed on a Bruker Biospec 70/20 spectrometer operated at 0.47 T (Bruker Biospin MRI, Ettlingen, Germany), controlled by ParaVision 3.0.2 acquisition and image analysis software. A resonator with an inner-diameter of 7 cm served as send-receive coil operating at the ^3He frequency of 15.5 MHz.

A radial pulse sequence ComSpiRa (COMbined SPIral and RADial) was used for acquisition of both spin density and diffusion-weighted images (6). All images were acquired in coronal orientation with no slice gradients applied (projection images). A block pulse of 0.2 ms duration was used as RF excitation pulse. The field of view (FoV) and repetition time (TR) were set to $80 \times 80 \text{ mm}^2$ and 10 ms, respectively.

For the anatomical images, 400 radial trajectories with 128 points per trajectory were collected. The radials were not acquired consecutively but using a phase stepping factor of 99. The matrix reconstruction size after regridding was 256x256, resulting in an in-plane resolution of 0.31x0.31 mm². A representative spin density image acquired with a single bolus of HP³He at a pressure of 12 mbar can be seen in **Figure 4.7**. The typical SNR value for anatomical images was ~ 31.

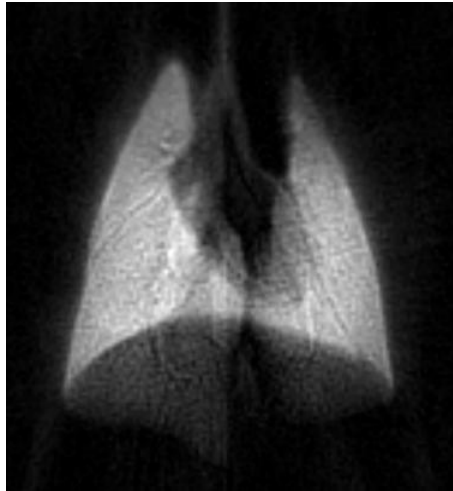


Figure 4.7

Representative ³He anatomical image. Trachea and bronchi can be seen as well as the shadow of the heart and a minor contribution of the lowest lobes of the lung. The higher signal intensity corresponds to the larger volume of the lung in the coronal projection.

Imagen anatómica típica de ³He. Se puede ver la tráquea y los bronquios así como la sombra debida al corazón y los lóbulos inferiores del pulmón contribuyendo en menor medida a la señal. Una intensidad de señal más alta corresponde a un mayor volumen del pulmón en la proyección coronal.

The most relevant pulse sequence parameters used for diffusion weighted (DW) images were: 200 radial trajectories, 64 points per trajectory, phase stepping factor of 49, and total diffusion time of 1.5 ms. The utilized b-values were 0.05, 0.707, 2.11 and 4.26 s·cm⁻². Diffusion gradients were applied in z-direction. The reconstruction size for the diffusion weighted images was 128x128 with a spatial resolution of 0.625x0.625 mm². The time

required to acquire the four DW-images was 8 s and was completed during the 10s-breath-hold. A set of the four DW-images with their corresponding b-values is shown in **Figure 4.8**.

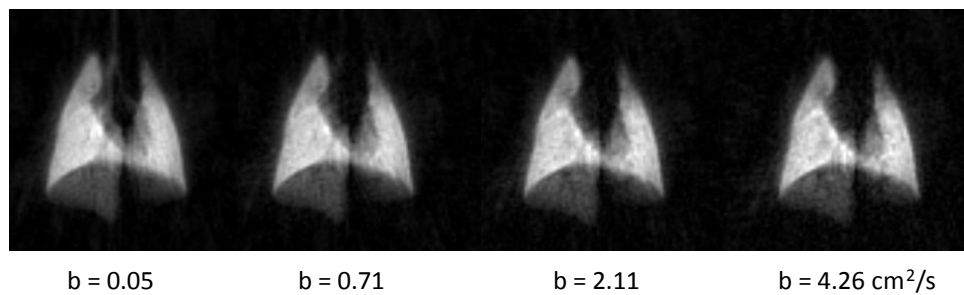


Figure 4.8

Set of ^3He diffusion weighted images. Both the image quality and the SNR decrease with increasing b-value. Trachea and bronchi are only recognizable in the lowest b-value image.

Imágenes de difusión de ^3He con sus correspondientes valores de b. Se observa una disminución tanto en la calidad de las imágenes como en la relación señal/ruido al incrementar el valor de b. La tráquea y los bronquios sólo se observan en la imagen obtenida con el menor de los valores de b.

4.5 ADC calculation and statistic analysis

Four regions of interest (ROIs) were defined for each DW-image as it is shown in **Figure 4.9**. Two of these ROIs accounted only for the most peripheral areas of both left (LL) and right (RL) lungs. Other ROI defined the contour of the whole lung. Finally, a circular ROI was delineated in an upper corner of the image containing only noise.

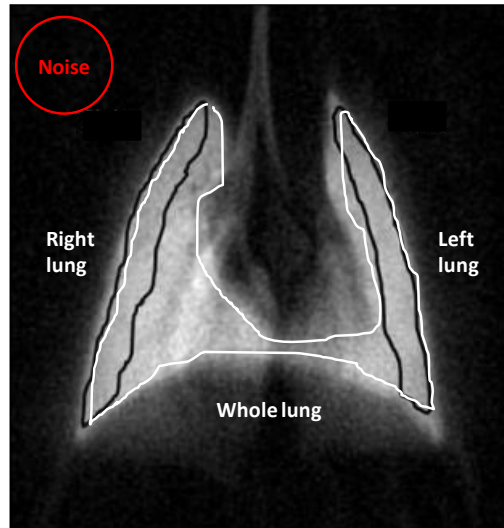


Figure 4.9

Definition of the regions of interest (ROIs) where the ADC is calculated from (Right lung, Left lung and Whole lung) and a region in the background (noise).

Regiones de interés (ROIs) en las que se calcula el ADC (pulmón derecho, pulmón izquierdo y pulmón completo) y fondo (ruido).

RL and LL were used to calculate as specifically as possible the ADC values for structures of the lung parenchyma. Thus trachea, major airways and central part of the lungs were excluded from these ROIs.

ADC value was calculated by fitting an exponential function (Eq. 3.10) to the mean signal intensity of the selected ROI. The calculation of ADC values and the fitting error were performed by ISA Tool (Image Sequence Analysis, Paravision, Bruker).

In some experiments the ADC values from the left and the right lung were considered separately whereas in others the ADC values obtained from both lungs (RL and LL) were averaged.

ADC maps were obtained by fitting the exponential to the signal intensity on a pixel-by-pixel basis considering the whole lung. A representative ADC map of an animal is shown in Figure 4.10 together with the color scale of the ADC values.

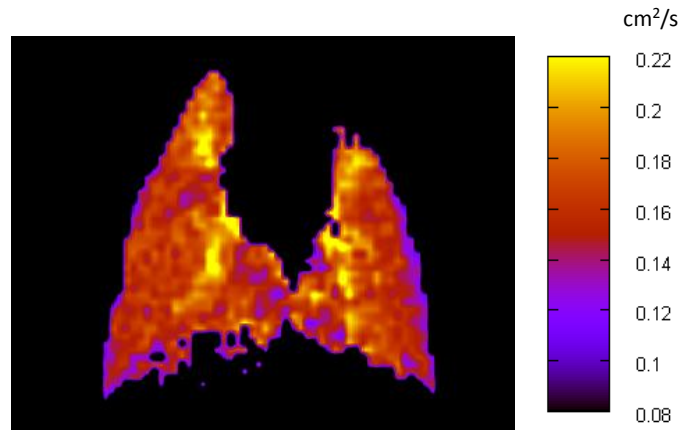


Figure 4.10

Representative ADC map

Mapa representativo de ADC

The statistical evaluation of the ADC values was performed using the software packages SAS Version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) and S-PLUS® 8.0 (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA).

For each particular comparison either Student's t-test (paired and unpaired) or analysis of variance (ANOVA) was chosen.

The signal to noise ratio (SNR) is calculated as the ratio of the average signal intensity of the lung (SI_{lung}) over the standard deviation of the noise (considered as real and imaginary) (σ_{noise}):

$$SNR = \frac{SI_{lung}}{\sigma_{noise}}$$

Where the standard deviation of real and imaginary components of the noise is calculated from the magnitude image as $\sigma_{noise} = \sqrt{2/\pi} SI_{noise}$

This procedure to calculate SNR gives almost no error if $SNR > 3$ (7).

We note that all of the lung images shown in this chapter correspond to the same animal.

References

1. Rudersdorf D. Entwicklung und Anwendung eines Beatmungssystems zur Untersuchung der Lungenfeinstruktur mittels He-3-Magnetresonanztomographie [dissertation]. Institut für Physik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2010.
2. Emami K, Ishii M, Kadlecsek S, MacDuffie-Woodburn J, Zhu J, Pickup S, Yu J, Stetz M, Stephen M, Rizi RR. Modeling dead Space in measurements of pulmonary ventilation hyperpolarized ^3He MRI. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2009;17.
3. Becker J, Heil W, Krug B, Leduc M, Meyerhoff M, Nacher PJ, Otten EW, Prokscha T, Scheerer LD, Surkau R. Study of mechanical compression of spin-polarized ^3He gas. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 1994;346(1-2):45-51.
4. Becker J, Bermuth J, Ebert M, Grossmann T, Heil W, Hofmann D, Humblot H, Leduc M, Otten EW, Rohe D, Surkau R. Interdisciplinary experiments with polarized ^3He . *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 1998;402(2-3):327-336.
5. Hiebel S, Grossmann T, Kiselev D, Schmiedeskamp J, Gusev Y, Heil W, Karpuk S, Krimmer J, Otten EW, Salhi Z. Magnetized boxes for housing polarized spins in homogeneous fields. *J Magn Reson* 2010;204(1):37-49.
6. Rodriguez I, Perez de AR, Cortijo M, Ruiz-Cabello J. COMSPIRA: A common approach to spiral and radial MRI. *Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering)* 2004;20B:40-44.
7. Gudbjartsson H, Patz S. The rician distribution of noisy mri data. *Magn Reson Med* 1995;34(6):910-914.

Capítulo 4: Dispositivo experimental y metodología para experimentación con HP^3He

4.1 Características del sistema de Ventilación y escáner de RM

4.2 Preparación de los animales para la experimentación

4.3 Protocolo de Ventilación

4.4 Protocolo de Imagen

4.5 Cálculo del ADC y análisis estadístico

Introducción

En éste capítulo se va a describir el dispositivo experimental común de todos los experimentos realizados con Helio. Se expondrá en detalle tanto el funcionamiento como los requisitos y restricciones de los componentes más importantes del dispositivo. Se hará referencia solamente al hardware del sistema de ventilación, mientras que el software se explicará en el Apéndice.

El manejo y la preparación de los animales también se tratarán en éste capítulo ya que la mayor parte del procedimiento empleado fue común en todos los experimentos de Helio. Sin embargo cada serie de experimentos presenta particularidades respecto al método y protocolo de ventilación, por lo que se especificará en la sección correspondiente. En este capítulo se describirán las características de ventilación que fueron comunes en todos los experimentos realizados.

También se describirá el protocolo de imagen con los parámetros más importantes de la secuencia utilizada. Finalmente, se incluyen la definición de las regiones de interés, el cálculo de los valores de ADC, la obtención de mapas de ADC y los estudios estadísticos.

4.1 Características del sistema de Ventilación y escáner de RM

El ventilador (compatible con el sistema de RM) puede tanto ventilar a los animales como mantener una apnea o aplicar una dosis de HP^3He . El proceso experimental se divide en dos

fases o modos: ventilación e imagen. En el primer caso, los animales inspiran y espiran el gas de ventilación y en el segundo caso, el animal recibe una dosis de HP-gas con el que se mantiene la apnea durante la cual se adquiere la imagen.

La **Figura 4.1** muestra un diagrama del dispositivo completo. Los elementos y sus posiciones se basan en requisitos fisiológicos y/o técnicos. Todos los elementos dentro de la línea roja en la figura se encuentran en el interior del imán durante la adquisición de la imagen.

El bloque de las válvulas de ventilación (recuadro amarillo) es la interfase entre el animal y el sistema de ventilación y se conecta al animal a través de un tubo endo-traqueal. Este bloque debe estar tan próximo al animal como sea posible con el fin de reducir el volumen muerto **(2)**. El bloque está constituido por tres válvulas: inspiración (V2), espiración (V1) y aplicación de HP³He (V5). Entre el bloque y el animal hay un manómetro (M4) que mide la presión en la tráquea en tiempo real.

En el modo de ventilación el sistema se conecta a la fuente del gas de ventilación, cuya presión, controlada por el manómetro (M2), se reduce al rango fisiológico (alrededor de unos pocos milibares) mediante un reductor de presión (R2). El gas de ventilación pasa a través de V2 inflando el pulmón del animal. Ambos, el flujo de gas y el tiempo que V2 está abierto determinan el nivel al que se infla el pulmón (volumen tidal, TV). La espiración tiene lugar cuando V1 se abre, mientras V2 está cerrada, permitiendo al animal que espire: cuanto más tiempo esté abierta V1, más cae la presión. La fase de espiración se considera finalizada cuando el tiempo que el animal está espirando es lo bastante largo para reducir la presión al valor atmosférico.

El término volumen tidal (TV) se usa exclusivamente para denotar el estado del pulmón cuando se infla con el gas de ventilación durante el modo de ventilación, mientras que se considera la presión al final de la inspiración (end-inspiratory pressure, EI) a la presión alcanzada al aplicar una dosis de HP³He.

³He se polariza usando el método de intercambio meta-estable **(3, 4)** que permite alcanzar un nivel de polarización del 69-71 %. La polarización se llevó a cabo en un polarizador construido en el Departamento de Física de la Universidad de Mainz (Alemania). Se usa una célula esférica de vidrio para contener un volumen de 1.1 L de HP-gas a una presión comprendida entre 2 y 3 bares por litro. Con objeto de conservar durante el mayor tiempo

posible la polarización del gas, la célula de vidrio tiene que ser transportada y mantenida en un campo magnético homogéneo (5). Por falta de espacio en la zona de campo magnético homogéneo dentro del imán se tuvo que colocar la célula en una caja de aislamiento fuera de la línea de 5G. La caja contiene un solenoide que crea un bajo campo magnético homogéneo. En la **Figura 4.1** se representan, dentro de la línea de puntos verde, todos los elementos contenidos dentro de la caja de aislamiento, es decir, tres válvulas neumáticas (V4, V6 y V7), una válvula estranguladora que regula el flujo de ^3He y un sensor de presión (M1) que mide la presión en la célula de vidrio. La **Figura 4.2** es una foto de la caja de aislamiento mostrando todos los elementos que contiene.

La válvula V4 controla el vacío del sistema y la V7 conecta el sistema con una fuente de nitrógeno usada para la limpieza de parte del circuito.

Una vez que la célula de vidrio se conecta al sistema, la válvula estranguladora se abre manualmente para regular el flujo de HP-gas. Las válvulas V6 y V3 se abren electrónicamente para liberar una dosis de HP- ^3He que fluye a través de un estrecho capilar desde la célula de vidrio hasta la bolsa de ^3He que está dentro de una caja de Plexiglas (**Figura 4.3**). La bolsa de ^3He se usa como reservorio de HP-gas y se encuentra dentro del imán tan próximo al animal como sea posible mientras se realiza el experimento. Un láser cruza el espacio libre entre el interior de la caja y la bolsa. Cuando la bolsa alcanza su máximo volumen (30 - 40 ml) durante el proceso de llenado, ésta corta el láser e interrumpe el proceso cerrando automáticamente las válvulas V6 y V3. Una vez que la bolsa está llena, en el espacio entre la bolsa y la caja se introduce ^4He a flujo constante que expulsa el HP-gas de la bolsa hacia el animal a través de V5. La presión al final de la inspiración se determina por el flujo del HP-gas y el tiempo que la válvula V5 permanece abierta. Una vez que se alcanza la presión deseada en los pulmones, se cierran las válvulas V5, V1 y V2 manteniendo una apnea. Durante el proceso de llenado de la bolsa, las válvulas de ventilación V1 y V2 continúan ventilando al animal pero se cierran en cuanto comienza el proceso de inflación del pulmón con ^3He . Inmediatamente después de la apnea, al animal se le permite continuar respirando a volumen tidal el gas de ventilación (V1 y V2, espiración e inspiración, respectivamente). Antes de repetir el proceso de llenado de la bolsa con una nueva dosis de HP-gas para la adquisición de una nueva imagen, el ^3He residual despolarizado se extrae de la bolsa mediante una bomba de vacío (V3 y V4 abiertas). El gas residual se almacena en un

contenedor para posterior reciclado que se realiza en el Departamento de Física de la Universidad de Mainz. Por cuestiones de higiene, únicamente se recicla el gas residual que ha quedado dentro de la bolsa de helio sin tener contacto con el animal.

4.2 Preparación de los animales para la experimentación

Los procedimientos utilizados en el manejo de animales fueron aprobados por el Comité Ético local.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo utilizando machos adultos de ratas Wistar. Los animales pesaban entre 240-260 g cuando llegaron al laboratorio y dependiendo del tipo de estudio y del protocolo seguido, su peso en el momento de la adquisición de las imágenes variaba entre 280 y 450 g.

Los animales fueron inducidos con solución salina ó con elastasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich Chemie) disuelta en solución salina, bajo los efectos de anestesia gaseosa (isoflurano). Una vez que los animales perdieron el reflejo se colocaron en una rampa, sostenidos por la boca, con el fin de ser intubados con un catéter de plástico de 12G (Vygon, Ecouen, Francia). El procedimiento de intubación fue realizado con la ayuda de un endoscopio PANOVIEW (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania). El catéter se introdujo solamente hasta la bifurcación de la tráquea. La administración de la solución salina ó de la elastasa se hizo a través este catéter. Se usaron dos modalidades de inducción: pulmón completo ó monolobular. En algunos experimentos la elastasa fue inducida en ambos pulmones (derecho e izquierdo) mientras que en otros solo se indujo el pulmón izquierdo. Para este último caso se insertó un capilar curvado dentro del catéter intra-traqueal orientado hacia el pulmón izquierdo. La modalidad monolobular fue solo utilizada en el caso de inducción con elastasa.

El volumen de solución salina administrada en la modalidad de inducción de pulmón completo fue de 0,4 ml mientras en el tratamiento monolobular fue de 0,2 ml. Veinte y 25 unidades de elastasa se disolvieron en solución salina para la inducción de pulmón completo y monolobular, respectivamente.

Los experimentos de imagen se llevaron a cabo a diferentes tiempos después de la inducción de elastasa. El tiempo transcurrido entre el tratamiento y la obtención de la imagen varió entre 4 y 8 semanas y será especificado en cada experimento.

Previo a la adquisición de las imágenes, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal con tiopental Na ó pentobarbital, a una concentración del 6% y con una dosis de 0,1 ml/100g peso animal (0,06 mg/kg). Después de que los animales perdieran el reflejo, se intubaron del mismo modo que se hizo para la inducción e inmediatamente después se conectaron al ventilador colocándolos en posición supina en la cama del imán.

La presión intra-traqueal de los animales fue monitorizada a tiempo real (manómetro M4), durante todo el tiempo en que estuvieron ventilados mecánicamente.

4.3 Protocolo de Ventilación

El ventilador no trabaja ni a volumen ni a presión fija, sin embargo controlando el tiempo en que las válvulas del sistema están abiertas o cerradas se puede ajustar la presión pulmonar a un valor deseado. El protocolo de ventilación consistió en periodos de inspiración y espiración a volumen tidal (TV), varios ciclos de prelavado y una apnea de 10s de duración, durante la cual tuvo lugar la adquisición de la imagen. Este esquema se repitió tantas veces como imágenes fueron necesarias pero teniendo en consideración que el tiempo total de experimentación no fuera demasiado largo para los animales.

Los ciclos de ventilación a volumen tidal se llevaron a cabo con un gas conteniendo 21 % de oxígeno, mientras que el gas usado para los prelavados y la apnea no contenía oxígeno. La apnea se realizó ó bien a la presión al final de la inspiración (end inspiration, EI) ó al final de la espiración (correspondiente al volumen al final de la espiración, EEV). En el segundo caso, el proceso se llevó a cabo permitiendo al animal espirar hasta alcanzar su capacidad pulmonar funcional (FLC) después de alcanzar la presión EI (**Figura 4.4**). Se usaron dos valores diferentes como presión final de inspiración (EI BH): ~12 y ~22 mbares (**Figura 4.5**). Estos dos valores pueden variar ligeramente de animal a animal debido a las diferencias de volumen pulmonar entre individuos. Previo a la aplicación de la apnea se aplicaron varios ciclos de prelavado. El número de prelavados varió entre 1 y 3 en un experimento (**Capítulo**

5.2), mientras que en el resto de experimentos el número de lavados fue 3 (**Figura 4.4 y Figura 4.5**).

En varios experimentos se aplicó durante la ventilación una presión positiva (positive end expiratory pressure, PEEP). Esto se llevó a cabo conectando una columna de agua, con la presión deseada, al tubo de espiración. En la mayoría de los casos se compararon los resultados obtenidos con PEEP5 (5 mbares de presión) y PEEP0 (0 mbares de presión). En otros experimentos se varió el PEEP de 0 a 8 mbares para estudiar su influencia en las medidas de ADC.

El efecto de aplicar un PEEP de 5 mbares puede verse en el esquema de ventilación a tiempo real de la **Figura 4.6**. ΔP indica el incremento de la línea base de presión cuando se aplica el PEEP.

Para más detalles del funcionamiento del software del sistema de ventilación véase el Apéndice.

4.4 Protocolo de Imagen

La imagen se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Biospec 70/20 de 0.47 T (Bruker Biospin MRI, Ettlingen, Alemania), controlado por ParaVision 3.0.2 para adquisición y análisis de imágenes. Una bobina de 7 cm de diámetro interno actúa como transmisor-receptor a la frecuencia de 15.5 MHz para el ^3He .

La secuencia radial ComSpiRa (COMbined SPIral y RAdial) fue la utilizada para la obtención de imágenes tanto de densidad de spin como de difusión (**6**). Todas las imágenes se obtuvieron en la orientación coronal sin aplicar gradientes de corte (imágenes proyectadas). Un pulso cuadrado de 0.2 ms de duración se usó como pulso de excitación de radiofrecuencia (RF). El campo de visión (FoV) y el tiempo de repetición (TR) fueron de $80 \times 80 \text{ mm}^2$ y 10 ms, respectivamente.

Para las imágenes anatómicas, se obtuvieron 400 trayectorias radiales con 128 puntos por trayectoria. Las radiales no se adquirieron consecutivamente sino usando un factor de paso de 99. El tamaño de reconstrucción de la matriz fue de 256×256 lo que resulta en una

resolución planar de $0.31 \times 0.31 \text{ mm}^2$. La **Figura 4.7** muestra una imagen típica de densidad de spin obtenida con HP^3He a una presión de 12 mbares. El valor típico de SNR en imágenes anatómicas fue ~ 31 .

Los parámetros más relevantes de la secuencia usados en las imágenes de difusión fueron: 200 trayectorias radiales, 64 puntos por trayectoria, un factor de paso de 49 y un tiempo de difusión total de 1.5 ms. Los cuatro valores de b tomados, fueron: 0.05, 0.707, 2.11 y 4.26 s cm^{-2} . Los gradientes de difusión se aplicaron en la dirección z . El tamaño de reconstrucción de la matriz en las imágenes de difusión fue de 128×128 con una resolución espacial de $0.625 \times 0.625 \text{ mm}^2$. El tiempo requerido para obtener las cuatro imágenes de difusión fue de 8 s y se completó durante los 10 s de apnea. Las imágenes de difusión para los cuatro valores de b se muestran en la **Figura 4.8**.

4.5 Cálculo del ADC y análisis estadístico

Se definieron cuatro regiones de interés (ROIs) para cada imagen de difusión (**Figura 4.9**). Dos de estos ROIs tuvieron en cuenta las áreas más periféricas de ambos pulmones, izquierdo (LL) y derecho (RL). Otro de los ROIs fue definido según el contorno del pulmón completo. Por último, se tomó una región circular en la parte superior de la imagen que contenía solo ruido.

RL y LL se usaron para calcular los valores de ADC que caracterizan las estructuras del parénquima pulmonar. Por ello, la tráquea, las grandes vías respiratorias y la zona central del pulmón fueron excluidas de estos ROIs.

Los valores ADC se calcularon mediante el ajuste de una exponencial (**Eq. 3.10**) a la media de la intensidad de señal del ROI seleccionado en las imágenes de difusión. El cálculo del ADC y de su error en el ajuste fue llevada a cabo con la herramienta ISA Tool (Image Sequence Analysis, Paravision, Bruker).

En algunos experimentos los valores de ADC obtenidos del pulmón izquierdo y del derecho se consideraron por separado, mientras que en otros experimentos los valores de ADC de ambos pulmones se promediaron.

Los mapas de ADC se obtuvieron ajustando una exponencial a la intensidad de señal de cada pixel de las imágenes de difusión para el pulmón completo. Un mapa típico de ADC se muestra en la **Figura 4.10** junto con la escala de color representando los valores ADC.

La evaluación estadística de los valores de ADC se llevó a cabo usando los software SAS Versión 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) y S-PLUS® 8.0 (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA).

Para cada comparación particular se escogió la prueba t de Student (pareada y no-pareada) ó el análisis de varianza ANOVA.

La relación señal ruido (SNR) se calculó como el cociente entre la señal de intensidad en el pulmón (SI_{lung}) y la desviación estándar de la parte real e imaginaria del ruido (σ_{noise}):

$$SNR = \frac{SI_{lung}}{\sigma_{noise}}$$

Donde la parte real e imaginaria del ruido se pueden calcular a partir de la señal de magnitud

como $\sigma_{noise} = \sqrt{2/\pi} SI_{noise}$

El cálculo de la relación señal / ruido descrito apenas da error cuando $SNR > 3$ **(7)**.

Todas las imágenes de pulmón que se muestran en éste capítulo corresponden al mismo animal.

Chapter 5

Role of certain parameters on ADC measurement: standard ventilation method

Papel de ciertos parámetros en las medidas de ADC: método de ventilación estándar

Chapter 5: Role of certain parameters on ADC measurement: standard ventilation method

5.1 Depolarization of the HP^3He over time

5.2 Effect of the number of prewashes on ADC values

5.3 Effect of PEEP application on ADC and SNR measurements

5.4 ADC reproducibility over ventilation time

5.5 ADC maps

5.6 Lung area measurements

5.7 ADC comparison between healthy and emphysematous animals

5.8 Discussion and Conclusions

Introduction

The principal aim of this chapter is to study certain parameters which may play an important role in the reproducibility, reliability and consistency of ADC measurements with HP-gases. To accomplish this goal some experiments were devoted to study and control a particular issue/parameter. ADC, SNR and lung area data were obtained using different ventilation parameters and/or ventilation procedures.

All animals used in the experiments described in this chapter were ventilated following a method that we will denote as “standard”. It consists of using room air to ventilate the animals at tidal volume and a bolus of pure HP^3He to apply a breath-hold (image acquisition). The gas used for the pre-washes was always the same as the one used for imaging, i.e. pure HP^3He in the standard method.

EI BH pressures at which the animals were imaged were either ~12 or ~22 mbar.

5.1 Depolarization of the HP^3He over time

HP^3He losses polarization over time and this depolarization occurs even faster in a non-homogeneous environment. Since the total acquisition time for the four DW-images was 8 s, we might expect some depolarization over this time period which would reduce the signal intensity.

A bolus of HP-gas is sent from the glass cell to the ^3He bag prior to be sent to the animal. The normal procedure in helium experiments is to transmit the gas to the lung as soon as the bag is full, minimizing the time of the process and thus the depolarization of the gas. However, in the experiment of this section, the gas was kept in the ^3He bag a period of time (“delay”) before sending the gas to the animal. The images of a single healthy animal were acquired once the gas reached the lung after a delay of 0, 10, 20, 30 and 45 s.

The goals in this section were to visualize and measure the decay in SNR at different delays and especially the SNR decrease between 0 to 8 s of delay, since this is the time period for the acquisition of the diffusion images. The SNR was calculated as mentioned in [Chapter 4.5](#) considering the whole lung and the ROI in the background ([Figure 4.9](#)).

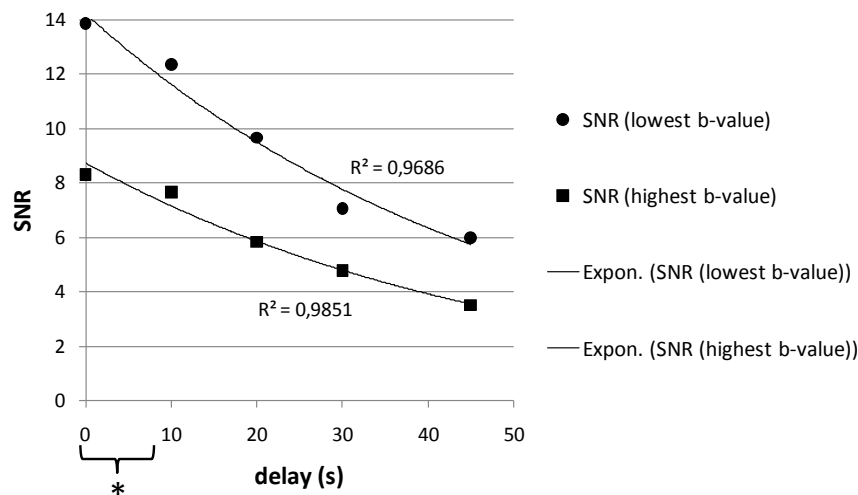


Figure 5.1

SNR values obtained from lowest and highest b-value images at different delays. The asterisk denotes the period (8 s) where the imaging is usually performed in helium experiments (acquisition time for diffusion weighted images).

Valores de SNR obtenidos a partir de las imágenes de menor y mayor valor de b. Las imágenes se adquirieron a diferentes tiempos de espera del gas dentro de la bolsa de He. El asterisco denota el periodo (8 s) en el que las imágenes de difusión son usualmente adquiridas en los experimentos de He.

The SNR values extracted from the lowest and the highest b-value images obtained at these delays are shown in [Figure 5.1](#). The figure shows the good correlation when fitting an exponential to the data points. The SNR decreased around 10% in the first 10 s. In order to

average the effect of the depolarization (loss of signal intensity) over the four diffusion images, the images were acquired following an interleaved scheme (see Chapter 3.5). Thus, the measured reduction of signal was exclusively due to the effect of the diffusion weighting. It is important to mention that the SNR values shown in this figure were significantly smaller than those ones that we usually obtained in ADC measurements. Typical mean SNR values (\pm SD) obtained from the lowest and the highest b-value images of HP³He experiments were 29 (± 2) and 21 (± 2), respectively.

5.2 Effect of the number of pre-washes on the ADC values

The principal idea of the application of wash cycles prior to the acquisition (pre-washes) was to exchange the ventilation gas (room air) for HP-gas to increase the amount of HP³He in the lung and therefore the SNR. To study the effect of pre-washes on the SNR, three healthy animals were imaged during a breath-hold applied after 1, 2 and 3 pre-washes. The SNR values obtained from the lowest b-value images did not significantly increase with the number of pre-washes (26 ± 2 and 27 ± 2 , for 1 and 3 wash cycles, respectively). This might be directly related to the fact that the higher number of pre-washes the longer the gas is in the He-bag and therefore the depolarization of the HP-gas increased, reducing the SNR. However, an increase of ADC when increasing the number of pre-washes was observed in the three animals (Figure 5.2). The increment in ADC (up to 5%, varying from animal to animal) between the values obtained with 1 and with 3 pre-washes was significant when performing Student's t-test ($p = 0.0478$). From these results we might conclude that the washing maneuver was not efficient for improving the SNR but suggested a dependency of ADC on the number of pre-washes.

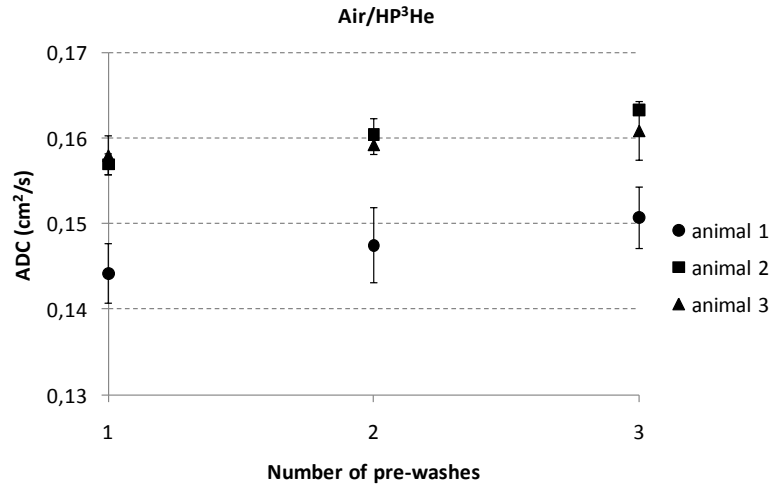


Figure 5.2

ADC dependence on number of pre-washes for three animals. The ADC values represent the mean ADC from left and right lungs and the error bars denote the standard deviation.

Dependencia de ADC con el número de prelavados en tres animales. Los valores de ADC representan la media de ADC del pulmón izquierdo y derecho. Las barras de error indican la desviación estándar.

The effect of increasing the number of wash cycles on ADC measurements in small animals were previously observed by Rudersdorf (1). This author showed a mean ADC increment of 17% between measuring after 1 and after 5 pre-washes in a set of 5 animals ($p < 0.0001$). In this dissertation theoretical calculations of the dependence of free ^3He diffusivity on the number of pre-washes were also performed (Figure 5.3). The asymptotic behavior of the diffusion coefficient to the value of $1.9 \text{ cm}^2/\text{s}$, seen in this figure, is because the self-diffusion coefficient introduced in the equation of this work was $1.9 \text{ cm}^2/\text{s}$ (2). However, other authors used slightly different values, e.g. $2.05 \text{ cm}^2/\text{s}$ (3) and $1.8 \text{ cm}^2/\text{s}$ (4). This figure indicates that for a number of wash cycles larger than ~ 9 the self-diffusion coefficient of ^3He would be reached.

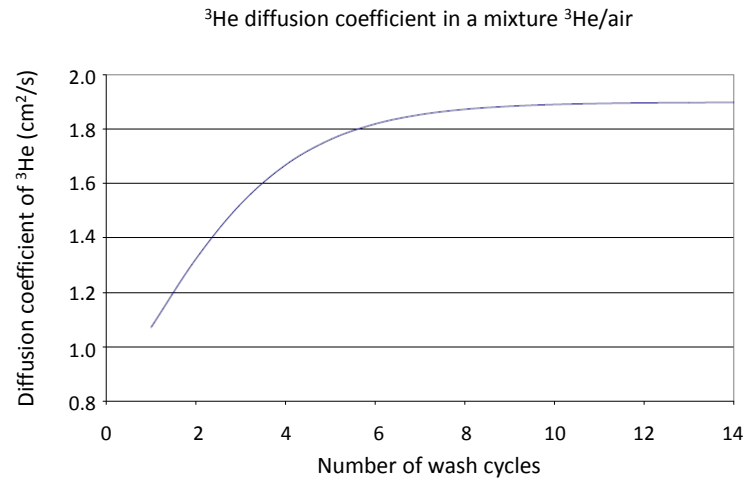


Figure 5.3

Theoretical calculation for the diffusion coefficient of ^3He related to the number of prewashes with ^3He . Adapted from Rudersdorf's dissertation (1).

Cálculo teórico del coeficiente de difusión de ^3He en relación al número de prelavados con ^3He . Adaptado de la tesis doctoral de Rudersdorf (1).

5.3 Effect of PEEP application on ADC and SNR measurements

Positive End Expiratory Pressure, PEEP, is considered a protective maneuver commonly used when mechanical ventilation systems are utilized. PEEP prevents the pressure to fall to zero on every breath minimizing the shear stress associated with the repeated opening and collapse of small airways and alveolar ducts (5). However, the determination of the ideal PEEP value must consider other factors, such as tidal volume and end inspiratory pressure (6).

To this respect, the effect of different levels of PEEP at a fixed tidal volume (corresponding to ~7 mbar) and fixed EI BH pressure (~13 mbar) was studied. Three animals breathed air at tidal volume while the water column was not yet connected. A bolus of pure HP ^3He was used to apply the three pre-washes and the breath-hold. Once the image was acquired in these conditions (PEEP0), the water column was connected (see Figure 4.6) and the procedure of washing and imaging was then repeated at several PEEP values ranging from 4 to 12 mbar (from 4 to 8 mbar for animal 3) by a step of 1 mbar.

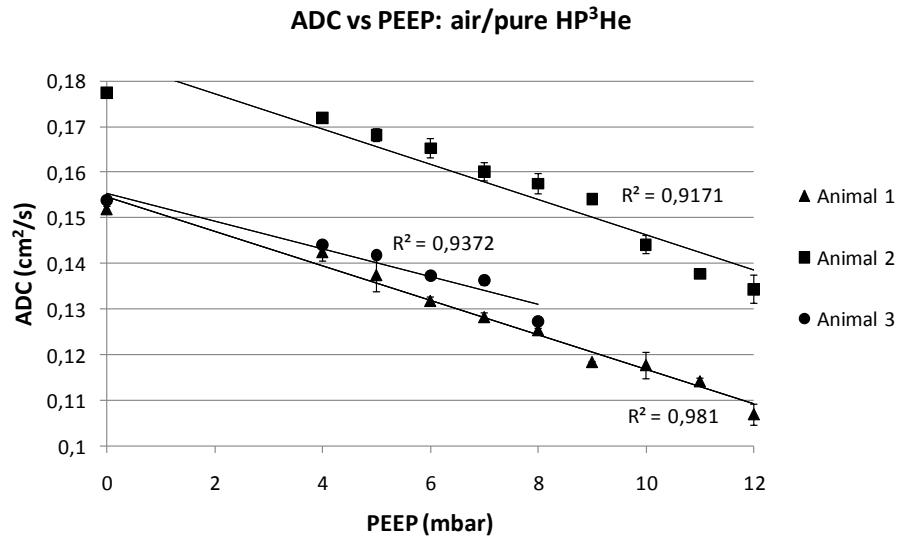


Figure 5.4

ADC-PEEP curve for three animals. Animals were ventilated with air and imaged with a bolus of pure HP³He during an EI BH of ~ 13 mbar.

Curva ADC-PEEP obtenida en tres animales. Los animales se ventilaron con aire y la imagen se adquirió con una dosis de HP³He puro, durante un EI BH de ~ 13 mbares.

Figure 5.4 shows the obtained ADC values of the three animals measured at different PEEP levels. The linear trend and the R-squared values for each animal are also shown. Animal 3 could only be measured up to 8 mbar. A significant ADC decay between 0 and 8 mbar ($p = 0.008$) was found. This represents a drop of 15.3% in ADC when averaging the decrease of the three animals. We note that most of the error bars (fitting error) are within the markers.

The quality of the images acquired when ventilating at higher PEEP values decreased drastically (**Figure 5.5**). This was expected since an EI BH pressure similar to the applied PEEP value implies a minimum inflation of the lung with the HP-gas (low amount of the incoming ³He), and thus a lower signal intensity which yields noisier images.

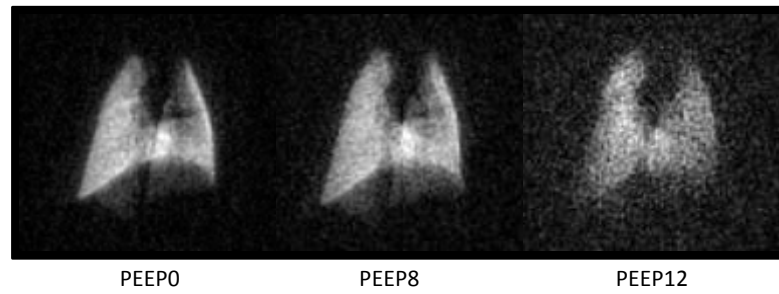


Figure 5.5

Images of animal 1 acquired at EI BH of 13 mbar at three different PEEP values (PEEP0, PEEP8 and PEEP12). The degradation of the image quality as increasing the PEEP can be seen.

Imágenes del animal 1 adquiridas a un EI BH de 13 milibares a tres valores diferentes de PEEP (PEEP0, PEEP8 y PEEP12). Se puede ver la degradación de la calidad de imagen al aumentar el valor de PEEP.

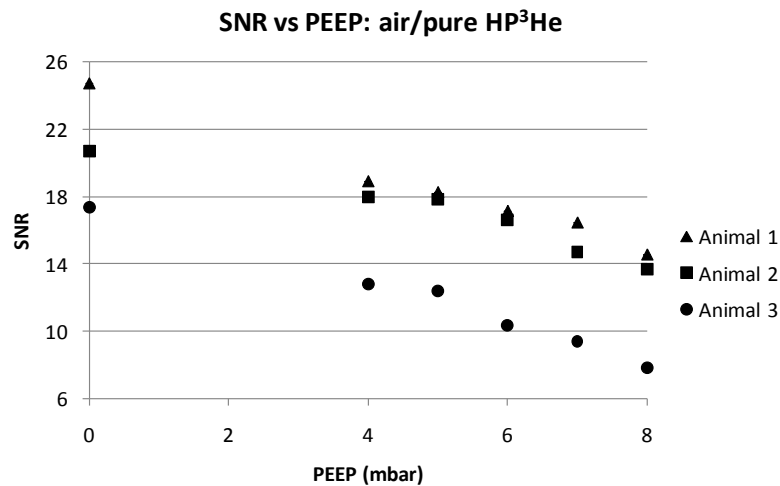


Figure 5.6

SNR-PEEP curve for three animals ventilated with air and imaged with pure HP^3He .

Curva de SNR frente a PEEP para tres animales ventilados con aire y medidos con HP^3He puro.

The effect of increasing the PEEP while keeping the same EI BH pressure on the SNR is seen in **Figure 5.6**. This SNR data was extracted from the same images as the ADC data (**Figure**

5.4) in the range from 0 to 8 mbar. The SNR values of the images of Animal 3 were lower than expected at any PEEP value. This might be a consequence of a lower polarization level of the HP-gas when this animal was measured.

A certain SNR level is required in order to avoid biases in the calculated ADC values. Numerical evaluations were performed by O'Halloran *et al* (7). They predicted an error of less than 0.2% in the mean ADC for ADC values smaller than or equal to 0.6 cm²/s at SNR above 15. At our typical ADC values (< 0.2 cm²/s) the percent error in mean ADC is 0.05% when SNR values of 10 are achieved and even lower at higher SNR values (see Table 5.1). Considering the values provided by O'Halloran, we might expect not to have ADC errors higher than 0.7% in any case at our typical SNR values (image quality).

Percent error in Mean ADC for specific SNR values				
Mean ADC cm ² /s	SNR ₀			
	5 (%)	10 (%)	15 (%)	20 (%)
0.2	0.7	0.05	0.016	
0.4	1.7	0.12	0.092	0.075
0.6	4.6	0.38	0.12	0.025
0.8	10	1.4	0.27	0.13

Table 5.1

Percent error in mean ADC for specific SNR values. Extracted from O'Halloran (7).

Error porcentual en la media de ADC para un valor específico de SNR. Valores extraídos de O'Halloran (7).

5.4 ADC reproducibility over ventilation time

A big concern was to ensure good ventilation conditions to the animals while they were mechanically ventilated. It is known that both improper use of mechanical ventilation (inadequate ventilation parameters) and forced ventilation exposure time can cause ventilator-induced lung injury (VILI). Walder *et al.* (8) evaluated the effect of the duration of mechanical ventilation with different tidal volumes in healthy rats. Their results demonstrated the preponderant effect of the duration (> 3h) of aggressive ventilation and a cut-off value of the level of tidal volume applied (> 27 ml/kg).

The main goal of performing repetitive ADC measurements was to study the reproducibility of this parameter at different ventilation conditions and thus to prove that neither the ventilation conditions nor the exposure time to the ventilator cause any damage to the animals.

The study was carried out in thirteen control animals which were divided in four groups to be ventilated at two different levels of PEEP (PEEP0 and PEEP5) and at two different EI BH pressures (22 and 12 mbar). The four groups were named: “22mbar-PEEP0”, “12mbar-PEEP0”, “22mbar-PEEP5” and “12mbar-PEEP5”. Animals were ventilated with air during 70 minutes and the data acquisition (application of an EI BH with HP-gas) occurred at five different time points: 10, 25, 40, 55 and 70 min of ventilation. Since the ventilation period at which animals were ventilated in all series of experiment was never longer than 70 min, the exposure time for the reproducibility study was limited to this time span. The position of the animals on bed and inside the magnet was kept the same during the whole ventilation period.

The mean ADC value and the standard deviation of each animal group at each time point are shown in **Figure 5.7**.

Figure 5.8 shows the individual ADC values and the error in the fitting to the exponential function of the particular group “22mbar-PEEP0”. The coefficient of variation (CV) obtained from the 5 repetitive measurements (time points) for animal 1, 2 and 3 of the group “22mbar-PEEP0” was 0.24, 0.95 and 0.78 %, respectively. The coefficient of variation of ADC for each animal of the rest of the groups was not in any case greater than 2% over the five measurements (data not shown). These results demonstrate not only a high ADC reproducibility in healthy rats under any of these ventilation conditions and ventilation exposure time but also a high reproducibility in the experimental procedure (application of the breath-hold).

Coefficient of variation of ADC for each animal group (4-5%) was higher than for individual subjects. This shows a higher inter-subject variability even among healthy animals measured under the same ventilation conditions.

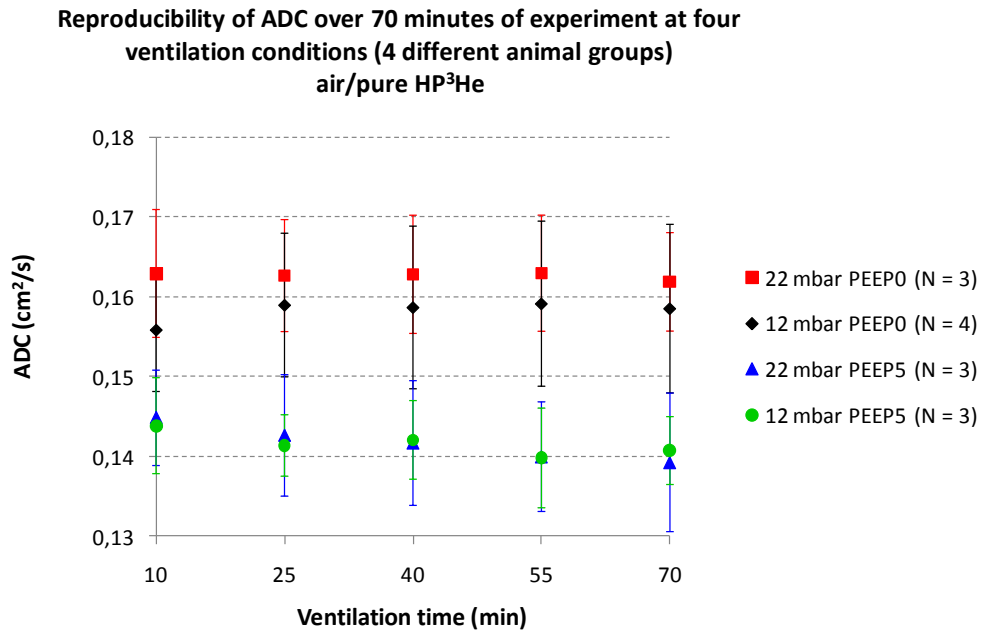


Figure 5.7

Mean ADC values and standard deviation of each animal group at five different time points of ventilation. The animal groups were classified depending on the ventilation conditions at which the animals were measured. The number of subjects in each animal group is specified in brackets.

Valores medios de ADC y su desviación estándar para cada grupo animal a cinco tiempos de ventilación diferentes. Los grupos de animales se clasificaron dependiendo de las condiciones de ventilación a las que se midieron. El número de animales en cada grupo está especificado entre paréntesis.

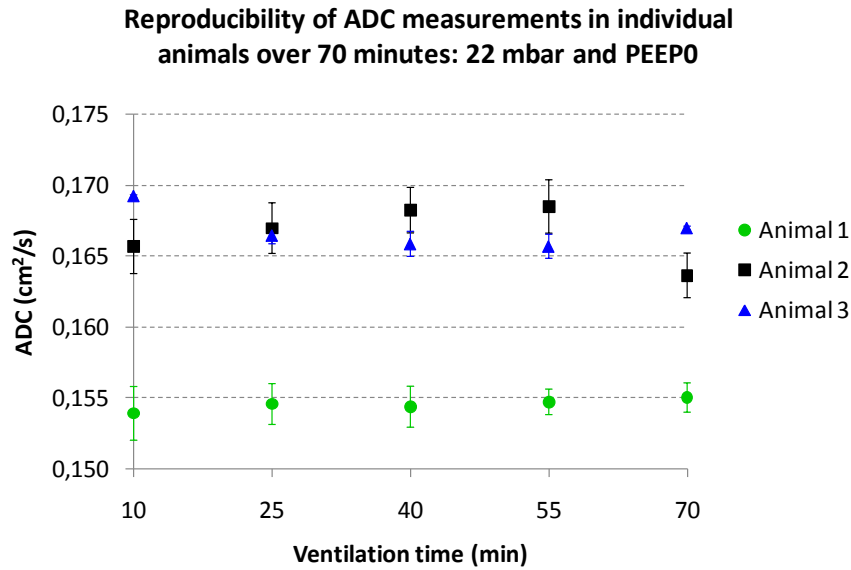


Figure 5.8

Individual ADC values at five different time points of ventilation for the three animals belonging to the group “22mbar-PEEP0”. The error bars represent the error in the fitting to the exponential function of each ADC measurement.

Valores individuales de ADC tomados a cinco tiempos de ventilación diferentes para los tres animales del grupo “22mbares-PEEP0”. Las barras de error representan el error en el ajuste a la exponencial para cada medida de ADC.

Some HP^3He ADC measurement reproducibility studies were performed in healthy volunteers. Morbach *et al.* found that in a global analysis the ADC was reproducible to 2% whereas a ROI-based analysis was around 6%. This was considered to be in the order of the variation resulting from small errors in ROI positioning, since the measurements were performed twice without repositioning the subject in the MR scanner (9). Salerno *et al.* imaged twice two healthy volunteers during one imaging session without moving the subject and they found a deviation from the mean ADC of $0.01 \text{ cm}^2/\text{s}$ ($\sim 4\%$ of error) for a certain slice (10). The higher errors found in humans compared to animal experiments could be due to the difference in lung inflation between breath-holds, which is minimized in animals thanks to the ventilator.

5.5 ADC maps

The ADC is not only dependent on the applied PEEP at a fixed EI BH pressure, as seen before, but also on the pressure at which the lung is inflated. This pressure can either be a certain end-inspiratory pressure (EI) or end-expiratory pressure (EEP). We note that EEV and EEP represent the same state of the lung (at the end of the expiration) from the point of view of volumes and pressures, respectively.

Figure 5.9 A) and C) show ADC maps obtained from a representative animal at two different EI BH pressures (12 and 22 mbar, respectively). Imaging at EEV was performed during a breath-hold at ~ atmospheric pressure after inflating the lung at either 12 or 22 mbar (see ventilation scheme: **Figure 4.4**). The ADC maps obtained at EEV after 12 and 22 mbar of end inspiration pressure are shown in **Figure 5.9 B) and D)**, respectively.

The ADC maps permit a direct visualization of the ADC values over the whole lung as well as the lung area. The lung imaged at EI BH-22mbar (C) shows the highest ADC values and the largest lung area. Conversely, the lowest ADC values appeared in the lungs measured at the end of the expiration, EEV (B and D).

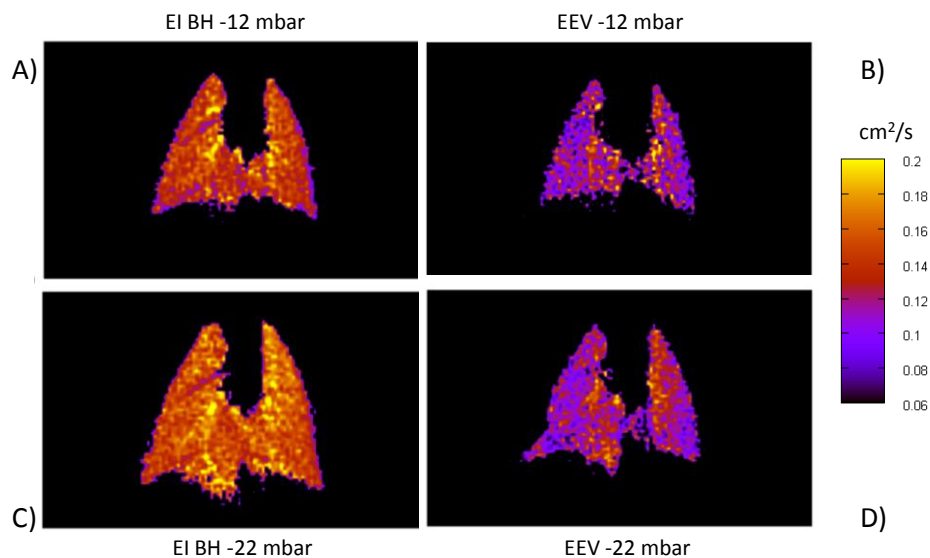


Figure 5.9

ADC maps of a representative animal measured at four different ventilation conditions.

Mapas de ADC de un animal medido a cuatro condiciones de ventilación distintas.

The ADC dependency on the lung inflation was also reported in healthy volunteers by Diaz *et al.* (11). They found statistical differences in ADC after inhalation of two different volumes (6% and 15% of total lung capacity).

5.6 Lung area measurements

Not only the ADC values and the ADC maps vary depending on the ventilation conditions at which the animals are imaged but also the lung area extracted from the images. A ROI which contours the whole lung is used to calculate the area of the lung in coronal projection images (see Figure 4.9). This was performed in three animals which were ventilated and imaged at the four ventilation conditions mentioned in the previous section. The mean value and the standard deviation of the lung area (cm²) for the three animals are shown in Figure 5.10.

Lung area at different ventilation conditions (N = 3)

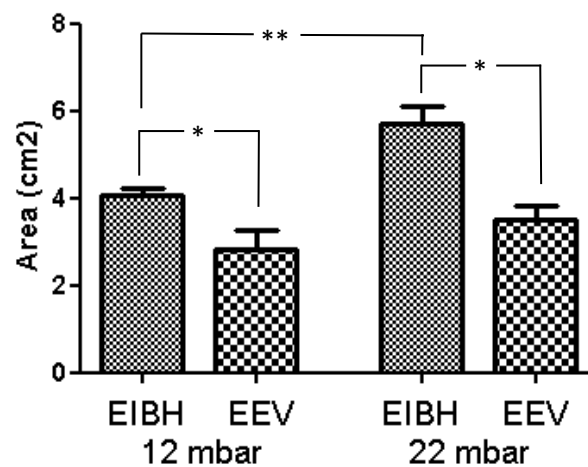


Figure 5.10

Mean lung area and the standard deviation of three animals measured at two different EI BH pressures and at EEV after inflating the lung at either 12 or 22 mbar of pressure. Pair-wise comparisons and level of significance (*) are also shown.

(*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$

Área pulmonar media y desviación estándar de tres animales medidos a dos presiones diferentes de EI BH y a EEV después de la inflación del pulmón a 12 ó 22 milibares de presión. Se muestra el nivel de significancia (*) entre grupos comparados.

(*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$

A paired Student's t-test comparing two by two the different conditions was performed. Differences in lung inflation yield to different lung area values which are marked in the figure with the respective level of significance (*). The statistic results did not show significant differences in lung area when comparing the animal groups imaged at EEV, EEV-12mbar and EEV-22mbar. Jacob *et al.* (12) reported different pressures at EEP (end expiration pressure) among animals, as a consequence of different lung compliance. This might also occur in our case when measuring at EEV, however, it does not apply to our results since we compared between different conditions for the very same animal (intra-subject comparison) and not between animals.

5.7 ADC comparison between healthy and emphysematous animals

So far, all experiments were carried out with healthy animals. In this section we will compare ADC data obtained from a group of control animals (N = 3) to another group which was whole-lung instilled with elastase (N = 6), as explained in Chapter 4.2. Animals were imaged 8 weeks after elastase challenge. As in Sections 5.5 and 5.6, the four ventilation conditions at which the animals were imaged were: EI BH-22mbar, EI BH-12mbar, EEV-22mbar and EEV-12mbar. No PEEP was applied in any of the ventilation conditions. As usual, animals breathed air at tidal volume and a bolus of pure HP^3He was applied for the three pre washes and the breath-hold (image acquisition). The mean ADC and standard deviation data for each ventilation condition and for both animal groups is plotted in Figure 5.11.

The major finding gleaned from the comparisons in this study was the lack of significant differences between control and elastase-treated animals at three of the four ventilation conditions (EI BH-12mbar, EEV-22mbar and EEV-12mbar) and a P value of 0.0498 when comparing the control and elastase-treated groups at EI BH-22mbar. Moreover, significant differences were found between measurements at EI BH and its corresponding EEV for each animal group.

Control vs Elastase-treated animals: air/pure HP³He

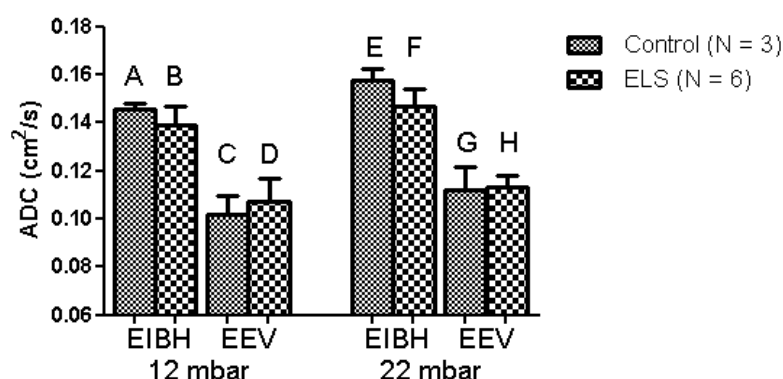


Figure 5.11

ADC data obtained from control and whole-lung elastase-treated animals measured at four ventilation conditions. Each column is named with a letter for simplification in the pair-wise comparison.

Datos de ADC obtenidos para las cuatro condiciones de ventilación en animales control y animales inducidos con elastasa en pulmón completo. Cada columna se ha nombrado con una letra para simplificar la comparación por pares.

For clarity a letter is assigned to each column in the figure. They are used for the pair wise comparisons (not shown in the figure) but the statistical results can be found in **Table 5.2**. A Student's t-test with two tails was performed in all the cases.

Pair-Wise comparison	AB	CD	EF	GH	AC	BD	EG	FH	AE	BF	CG	DH
Paired (P) /Unpaired (U)	U	U	U	U	P	P	P	P	P	P	P	P
p value	0.183	0.401	0.0498	0.792	0.0152	0.0005	0.0151	0.0001	0.0317	0.111	0.289	0.133
Significance	No	No	*	No	*	***	*	***	*	No	No	No

Table 5.2

Pair-wise comparisons performed with Student's t-test (paired or unpaired) showing the p-value and the significance level for control and whole-lung elastase-induced animals.

Comparación por pares obtenida con la prueba t de Student (pareada o no-pareada) mostrando el valor de p y el nivel de significancia en animales sanos y tratados con elastasa en pulmón completo.

5.8 Discussion and conclusions

Of particular concern was to study the reproducibility of ADC measurements at different ventilation conditions. The observed low intra-individual variability (<2%) can be taken as a consequence of the application of non-aggressive mechanical ventilation conditions and the relatively short exposure time of the animals to a mechanical ventilation system. When considering animal groups the coefficient of variation raises up to 5%, indicating that the inter-subject variability was larger than the intra-subject variability. The inter-subject variability of certain physiological parameters, such as pulmonary compliance and functional residual volume has already been reported by other authors even within healthy animal groups (13, 14).

The washing maneuver proved not to be efficient for improving the SNR in our images. This could be attributed either to the low number of pre-washes used in our experiments, 3, or to the depolarization of the gas during the pre-washing maneuver or both together. The application of a larger number of washes would have required a larger amount of consumed HP-gas and a longer time of the gas in the He-bag. Although this maneuver did not improve the quality of the images, it revealed a dependence of ADC on the number of pre-washes. As calculated by Rudersdorf (1) a number of cycles superior to 9 yields to reach the self-diffusion coefficient value for ^3He , because all the air inside the lung will be completely exchanged for HP^3He after this number of pre-washes.

As well as for the number of pre-washes, the application of a PEEP showed changes in ADC when imaging at a fixed pressure. It has been clearly seen that the ADC decreases when increasing the PEEP level. The introduction of the PEEP can be considered as an enlargement of the residual volume of the lung, preventing the lung pressure to decay to the atmospheric pressure at the end of the each expiration. When measuring at a fixed EI BH pressure, the amount of HP-gas which is used to inflate the lung up to this EI BH pressure is smaller at higher PEEP. In the particular case of ventilating the animals with room air, the PEEP will increase not only the amount of this gas but also the relative concentration of air in the lung. Since the diffusion coefficient for air is smaller than for helium, we might expect that lungs containing a higher concentration of air would show smaller diffusion coefficients and thus smaller ADC values. This hypothesis would also explain the effect of number of prewashes

on the ADC; the larger number of prewashes, the more volume of air is exchanged for helium and therefore the higher the ADC values.

Moreover, the same hypothesis might also apply to the case of comparing healthy and elastase-treated animals. The elastase-treated animals develop emphysema which will increase both the alveolar size and the residual volume. It is expected that larger alveolar sizes yields to higher ADC values but on the other hand the increase in residual volume (similar to the application of a PEEP) would yield a decrease in ADC. Since these two factors are opposed, the interpretation of the comparative results between emphysematous and healthy animals might be misunderstood, reducing and even reversing the differences. ADC differences between healthy and emphysematous tissue have been already reported in several publications in both animals (12, 15, 16) and human (11, 17-19) studies and therefore it has been accepted as a parameter to detect emphysema. However, it has been shown that other factors affect the ADC measurements revealing the crucial role of accounting for them in order to use ADC as a reliable biomarker.

The validation of this hypothesis will be the score of the next chapter. Furthermore, a novel ventilation protocol which minimizes the effect of gas concentration on ADC measurements will be described and tested.

References

1. Rudersdorf D. Entwicklung und Anwendung eines Beatmungssystems zur Untersuchung der Lungenfeinstruktur mittels He-3-Magnetresonanztomographie [dissertation]. Institut für Physik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2010.
2. Acosta RH, gulle-Pedros L, Komin S, Sebastiani D, Spiess HW, Blumler P. Diffusion in binary gas mixtures studied by NMR of hyperpolarized gases and molecular dynamics simulations. *Phys Chem Chem Phys* 2006;8(36):4182-4188.

3. Chen XJ, Moller HE, Chawla MS, Cofer GP, Driehuys B, Hedlund LW, Johnson GA. Spatially resolved measurements of hyperpolarized gas properties in the lung in vivo. Part I: diffusion coefficient. *Magn Reson Med* 1999;42(4):721-728.
4. Bock M. Simultaneous T2* and diffusion measurements with 3He. *Magn Reson Med* 1997;38(6):890-895.
5. Gajic O, Lee J, Doerr CH, Berrios JC, Myers JL, Hubmayr RD. Ventilator-induced cell wounding and repair in the intact lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1057-1063.
6. Halter JM, Steinberg JM, Gatto LA, DiRocco JD, Pavone LA, Schiller HJ, Albert S, Lee HM, Carney D, Nieman GF. Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. *Crit Care* 2007;11(1):R20.
7. O'Halloran RL, Holmes JH, Altes TA, Salerno M, Fain SB. The effects of SNR on ADC measurements in diffusion-weighted hyperpolarized He-3 MRI. *Journal of Magnetic Resonance* 2007;185(1):42-49.
8. Walder B, Fontao E, Totsch M, Morel DR. Time and tidal volume-dependent ventilator-induced lung injury in healthy rats. *Eur J Anaesthesiol* 2005;22(10):785-794.
9. Morbach AE, Gast KK, Schmiedeskamp J, Dahmen A, Herweling A, Heussel CP, Kauczor HU, Schreiber WG. Diffusion-weighted MRI of the lung with hyperpolarized helium-3: a study of reproducibility. *J Magn Reson Imaging* 2005;21(6):765-774.
10. Salerno M, Brookeman JR, de Lange EE, Knight-Scott J, Mugler JP, III. Demonstration of an alveolar-size gradient in the healthy human lung: A study of the reproducibility of Hyperpolarized 3He diffusion MRI. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2000.
11. Diaz S., Casselbrant I., Piitulainen e., Pettersson G., agnusson P., Peterson B., Wollmer P., Leander P., Ekberg O., Akeson P. Hyperpolarized 3He Apparent Diffusion Coefficient MRI of the Lung: Reproducibility and Volume Dependency in Healthy Volunteers and Patients With Emphysema. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:763-770.

12. Jacob RE, Minard KR, Laicher G, Timchalk C. 3D ^3He diffusion MRI as a local in vivo morphometric tool to evaluate emphysematous rat lungs. *J Appl Physiol* 2008;105(4):1291-1300.
13. Lai YL, Hildebrandt J. Respiratory mechanics in the anesthetized rat. *J Appl Physiol* 1978;45(2):255-260.
14. Palecek F. Measurement of ventilatory mechanics in the rat. *J Appl Physiol* 1969;27(1):149-156.
15. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of ^3He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
16. Dugas JP, Garbow JR, Kobayashi DK, Conradi MS. Hyperpolarized (^3He) MRI of mouse lung. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1310-1317.
17. Altes TA, Mata J, de Lange EE, Brookeman JR, Mugler JP, III. Assessment of lung development using hyperpolarized helium-3 diffusion MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2006;24(6):1277-1283.
18. Saam BT, Yablonskiy DA, Kodibagkar VD, Leawoods JC, Gierada DS, Cooper JD, Lefrak SS, Conradi MS. MR imaging of diffusion of (^3He) gas in healthy and diseased lungs. *Magn Reson Med* 2000;44(2):174-179.
19. Yablonskiy DA, Sukstanskii AL, Leawoods JC, Gierada DS, Bretthorst GL, Lefrak SS, Cooper JD, Conradi MS. Quantitative in vivo assessment of lung microstructure at the alveolar level with hyperpolarized ^3He diffusion MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(5):3111-3116.

Capítulo 5: Papel de ciertos parámetros en las medidas de ADC: método de ventilación estándar

- 5.1 Despolarización del HP^3He con el tiempo**
- 5.2 Efecto del número de prelavados en el ADC**
- 5.3 Efecto de la aplicación de un PEEP en las medidas de ADC y SNR**
- 5.4 Reproducibilidad del ADC con el tiempo de ventilación**
- 5.5 Mapas de ADC**
- 5.6 Medida del área pulmonar**
- 5.7 Comparación de ADC entre animales sanos y enfisematosos**
- 5.8 Discusión y conclusiones**

Introducción

El principal objetivo de éste capítulo es estudiar aquellos parámetros que pueden jugar un papel importante en la obtención de medidas de ADC con gas hiperpolarizado haciéndolas que sean reproducibles, fiables y consistentes. Para estudiar el comportamiento de un parámetro en particular, se planificaron específicamente algunos experimentos. A lo largo de este capítulo se presentarán datos de ADC, SNR y de área pulmonar, obtenidos usando diferentes parámetros y/o procedimientos de ventilación.

Todos los animales usados en los experimentos descritos en este capítulo se ventilaron siguiendo un método que denominaremos “estándar”. En él se usa aire para ventilar a los animales a volumen tidal y una dosis de HP^3He puro para la apnea (adquisición de la imagen). El gas usado para los prelavados fue el mismo que el usado para la apnea (HP^3He puro en el caso del método estándar) en todos los experimentos.

Las imágenes se adquirieron al final de la inspiración a una presión aproximada de 12 ó 22 milibares.

5.1 Despolarización del HP³He con el tiempo

El HP³He pierde polarización con el tiempo y esto tiene lugar con mayor rapidez en medios no homogéneos. Ya que el tiempo necesario para la adquisición de las cuatro imágenes de difusión es de 8 s, cabe esperar que el gas pierda parte de su polarización a lo largo de este tiempo, lo que reduciría la intensidad de la señal.

Con cada dosis de HP-gas que sale de la célula de gas se llena la bolsa de ³He usada como reservorio antes de hacerle llegar el gas al animal. El procedimiento usual en experimentos de helio consiste en enviar el gas al animal tan pronto como la bolsa de ³He esté llena. Sin embargo, en esta sección, el gas se mantuvo en la bolsa por un periodo de tiempo (“delay”) antes de enviarlo al animal. Las imágenes se adquirieron una vez que el gas se enviara al animal después de que se retuviera en la bolsa de ³He 0, 10, 20, 30 y 45 s.

Los objetivos en esta sección fueron tanto el ver la disminución del SNR a estos tiempos como medir la diferencia de SNR en un periodo de 8 s (desde 0 hasta 8) que es la duración de la adquisición de las cuatro imágenes de difusión.

Para el cálculo del SNR (**Capítulo 4.5**) se tuvo en cuenta el pulmón completo y el ROI definido como ruido (**Figura 4.9**). La **Figura 5.1** muestra los valores de SNR obtenidos a partir de las imágenes con menor y mayor valor de b . La figura muestra la buena correlación al ajustar la exponencial a los datos obtenidos. La disminución del SNR en los primeros 10 s fue aproximadamente de un 10 %. Para promediar el efecto de la depolarización del gas (pérdida de intensidad de señal) a lo largo de las cuatro imágenes DW, las imágenes se adquirieron de forma no-secuencial como se explicó en el **Capítulo 3.5**. Así, la reducción medida de la intensidad de señal fue exclusivamente debida al efecto de la difusión.

Es importante mencionar que los valores de SNR mostrados en la **Figura 5.1** fueron significativamente menores que los que normalmente se obtienen en las medidas de ADC. Los valores promedio de SNR obtenidos en los experimentos de helio a partir del menor y mayor valor de b fueron 29 (± 2) y 21 (± 2), respectivamente.

5.2 Efecto del número de prelavados en el ADC

La idea principal de la aplicación de ciclos de lavado (prelavados) antes de la adquisición de la imagen fue la de intercambiar el gas de ventilación (aire) por gas hiperpolarizado para incrementar la cantidad de HP³He en el pulmón y a su vez el SNR.

Para estudiar el efecto de los prelavados en el SNR se adquirieron imágenes en tres animales sanos durante una apnea aplicada después de 1, 2 y 3 prelavados. Los valores de SNR obtenidos a partir de las imágenes adquiridas con el menor valor de b , no incrementaban significativamente con el número de prelavados (26 ± 2 y 27 ± 2 , para 1 y 3 ciclos de lavado, respectivamente). Este efecto puede estar directamente relacionado con el hecho de que a mayor número de prelavados mayor es el tiempo que transcurre el gas en la bolsa de helio y por lo tanto mayor es la depolarización del ^3He , reduciendo el SNR. Sin embargo, se observó en los tres animales un incremento de los valores de ADC cuando incrementaba el número de prelavados (**Figura 5.2**). El incremento de ADC (hasta de un 5 %, variando de animal a animal) entre los valores obtenidos con 1 y con 3 prelavados mostró una diferencia significativa cuando se aplicaba la prueba t de Student ($p = 0.0478$). A partir de estos resultados pudimos concluir que la estrategia de lavado no fue eficiente para mejorar el SNR pero si indicaba la dependencia del ADC con el número de prelavados.

Rudersdorf **(1)** observó previamente el efecto del aumento del número de lavados en las medidas de ADC en ratas. Este autor mostró que la media de valores de ADC incrementaba un 17 % entre medir después de uno ó de cinco prelavados, para un conjunto de 5 animales ($p < 0.0001$). En su trabajo llevó a cabo también los cálculos teóricos de la dependencia de la difusión libre del ^3He con el número de prelavados. El coeficiente de difusión para el helio introducido en la ecuación por Rudersdorf fue de $1.9 \text{ cm}^2/\text{s}$ **(2)**, mientras que otros autores usaban valores ligeramente diferentes, e.g. $2.05 \text{ cm}^2/\text{s}$ **(3)** y $1.8 \text{ in cm}^2/\text{s}$ **(4)**. Por esta razón que se vea un comportamiento asintótico al valor de $1.9 \text{ cm}^2/\text{s}$ en la **Figura 5.3** obtenida por Rudersdorf. Esta figura muestra que para un número de ciclos de lavado superior a ~ 9 se alcanzaría el coeficiente de auto-difusión del ^3He .

5.3 Efecto de la aplicación de un PEEP en las medidas de ADC y SNR

Cuando se utilizan sistemas de ventilación mecánica, se usa comúnmente una presión positiva ó PEEP (Positive End Expiratory Pressure) como mecanismo protector. El PEEP previene que la presión caiga a cero en cada espiración minimizando el estrés asociado a la apertura y cierre de alveolos y conductos alveolares **(5)**. Sin embargo, para determinar el

valor ideal de PEEP se debe tener en cuenta diversos factores, como el volumen tidal y la presión al final de la inspiración (6).

Para ello, estudiamos el efecto de diferentes niveles de PEEP a un volumen tidal fijo (correspondiente a ~7 mbar) y a una presión El BH fija (~ 13 mbar). Tres animales se ventilaron con aire a volumen tidal, no estando conectada la columna de agua. En estas condiciones se aplicó una dosis de HP^3He puro para los tres prelavados y la apnea, en la que se adquirió la imagen (PEEP0). Posteriormente se conectó la columna de agua (ver Figura 4.6) y el proceso de lavado y adquisición de la imagen se repitió para varios valores de PEEP, en un rango entre 4 y 12 mbares (entre 4 y 8 mbar para el animal 3) con un peldaño de 1 mbar.

La Figura 5.4 muestra los valores de ADC obtenidos para los tres animales que se midieron a diferentes niveles de PEEP, así como el ajuste lineal de los valores de ADC y los valores de R^2 . El animal 3 sólo se pudo medir hasta una presión de PEEP de 8 mbares. Se observó un descenso significativo del ADC entre 0 y 8 mbares ($p = 0.008$), lo que representa una caída del 15.3 % en los valores de ADC al promediar los datos obtenidos de los tres animales. Además se observó que la calidad de las imágenes adquiridas con los valores más elevados de PEEP decrecía drásticamente (Figura 5.5). Esto era de esperar ya que una presión de El BH similar al valor de PEEP aplicado, implica una mínima inflación del pulmón con el gas hiperpolarizado (bajo volumen de He) y así una intensidad de señal más baja, lo que conlleva a su vez a imágenes más ruidosas.

El efecto del incremento de PEEP sobre el SNR a una presión El BH fija se muestra en la Figura 5.6. Estos datos de SNR se extrajeron de las mismas imágenes que los datos de ADC (Figura 5.4) para el rango de 0 a 8 mbares. Los valores de SNR de las imágenes del Animal 3 fueron menores que los esperados para todos los valores de PEEP. Esto puede ser consecuencia de una baja polarización del HP^3He cuando se midió este animal.

Se requiere un determinado valor de SNR para evitar que los valores de ADC se vean afectados. Cálculos numéricos para evaluar este efecto fueron llevados a cabo por O'Halloran *et al.* (7). Estos autores predijeron un error inferior al 0.2 % en la media de ADC, para valores de ADC menores ó iguales a $0.6 \text{ cm}^2/\text{s}$ para SNR por encima de 15. Sin embargo a nuestros valores típicos de ADC ($< 0.2 \text{ cm}^2/\text{s}$) el porcentaje de error de la media del ADC sería 0.05 % para un SNR de 10 y todavía menores para valores de SNR superiores a 10 (Tabla 5.1). Para el valor mínimo de SNR obtenido en nuestras medidas (PEEP8) y

considerando los valores deducidos por O'Halloran, se puede asumir un error en el ADC no superior al 0.7 %.

5.4 Reproducibilidad del ADC con el tiempo de ventilación

Se sabe que un uso inapropiado del sistema de ventilación mecánica y/o un tiempo excesivo de ventilación pueden causar daños al pulmón inducidos por el ventilador (VILI, ventilation induced lung injury). Walder *et al.* (8) evaluaron el efecto que producía, en ratas sanas, la duración de la ventilación mecánica a diferentes volúmenes tidal. Los resultados demostraron el efecto preponderante que ejercía la duración de una ventilación agresiva (> 3 h) y el valor del volumen tidal aplicado (> 27 ml/kg).

El principal objetivo de realizar medidas repetitivas de ADC, fue estudiar la reproducibilidad de este parámetro a diferentes condiciones de ventilación, y así probar, que tanto las condiciones de ventilación como el tiempo de exposición, no causarían ningún daño a los animales, pudiendo ser utilizadas para el resto de experimentos.

Este estudio fue llevado a cabo en trece animales control, divididos en cuatro grupos, que fueron ventilados a dos valores diferentes de PEEP (PEEP0 y PEEP5) y a dos presiones diferentes de EI BH (22 y 12 mbares), que denominamos: "22mbar-PEEP0", "12mbar-PEEP0", "22mbar-PEEP5" y "12mbar-PEEP5". Los animales se ventilaron con aire durante 70 minutos y la adquisición de la imagen (aplicación de una apnea a EI BH con HP-gas) se realizó a los 10, 25, 40, 55 y 70 minutos después haber empezado a ventilar los animales. El estudio de la reproducibilidad de ADC se limitó a 70 minutos ya que éste fue el tiempo de exposición máximo planeado para el resto de los experimentos. La posición de los animales (en la cama y en el escáner) fue la misma durante todo el periodo de ventilación.

La **Figura 5.7** muestra los valores medios de ADC y la desviación estándar para cada grupo de animales y para cada tiempo de ventilación. La **Figura 5.8** muestra los valores individuales de ADC y el error en el ajuste a la exponencial para los animales pertenecientes al grupo "22mbar-PEEP0". El coeficiente de variación (CV) obtenido de las 5 medidas repetidas a lo largo del tiempo, para los animales 1, 2 y 3 del grupo "22mbar-PEEP0", fue 0.24, 0.95 y 0.78 % respectivamente. El coeficiente de variación de ADC de las cinco medidas repetidas para cada animal del resto de los grupos no fue en ningún caso superior al 2 % (datos no mostrados). Estos resultados demuestran no solo una gran reproducibilidad del ADC en ratas

sanos bajo cualquiera de estas condiciones de ventilación y tiempo de exposición sino también la alta reproducibilidad del procedimiento experimental (aplicación de las apneas). Por otro lado se obtuvo que el coeficiente de variación de ADC para cada grupo animal fue más elevado ($CV \sim 4\text{-}5\%$) que para sujetos individuales, aunque éstos hubieran sido medidos bajo las mismas condiciones de ventilación.

Ciertos estudios de reproducibilidad de las medidas de ADC con HP^3He , se llevaron a cabo en humanos (voluntarios sanos). Morbach *et al.* encontraron que un análisis global del ADC fue reproducible en el 2% mientras que un análisis basado en ROIs era aproximadamente del 6%. Se consideró que esto estaba dentro de la variación debida a pequeños errores en la posición del ROI, ya que las medidas se realizaron sin reposicionamiento de los sujetos (9). Salerno *et al.* adquirieron dos medidas repetidas a dos voluntarios sanos durante la misma sesión (no reposicionamiento). Para un mismo corte de la imagen, encontraron una desviación en la media de ADC de $0.01\text{ cm}^2/\text{s}$ ($\sim 4\%$ de error) (10). La mayor variación del ADC encontrada en medidas en humanos comparada con los experimentos en animales, podrían ser debidas a diferencias en la inflación del pulmón entre apneas, lo cual se puede minimizar en la experimentación animal gracias al uso del ventilador.

5.5 Mapas de ADC

El ADC no solo depende del PEEP aplicado a una presión fija de EI BH, como se vio anteriormente, sino también de la presión a la cual se infla el pulmón. Esta presión puede ser o bien al final de la inspiración (EI) o bien al final de la espiración (EEP). EEV y EEP representan el mismo estado del pulmón (al final de la espiración) pero desde el punto de vista de volúmenes o de presiones, respectivamente.

Las Figuras 5.9 A) y C) muestran los mapas de ADC obtenidos a dos presiones diferentes de EI BH (12 y 22 mbar, respectivamente) en un animal representativo. La imagen a EEV se obtuvo durante una apnea, a presión atmosférica, aplicada después de inflar el pulmón bien a 12 ó a 22 mbares (véase esquema de ventilación: Figuras 4.5 y 4.6). Los mapas de ADC obtenidos a EEV después de la inspiración a 12 ó 22 mbares se muestran en las Figuras 5.9 B) y D), respectivamente.

Los mapas de ADC permiten la visualización directa de los valores de ADC del pulmón completo así como la del área pulmonar. La imagen del pulmón a EI BH-22 mbares (C) muestra los valores de ADC más altos y el mayor área pulmonar. Por el contrario, los valores más bajos de ADC aparecen en pulmones medidos al final de la espiración EEV (B y D).

La dependencia de ADC con la inflación del pulmón fue observada también por Diaz *et al.* (11), en voluntarios sanos. Encontraron diferencias estadísticas en los valores de ADC después de la inhalación de dos volúmenes de gas diferentes (6% y 15% de la capacidad total pulmonar).

5.6 Medidas del área pulmonar

No solamente los valores y mapas de ADC varían dependiendo de las condiciones de ventilación en las que se adquiere la imagen, sino también, el área pulmonar extraída de las imágenes.

Con objeto de calcular el área pulmonar en imágenes de proyección coronal se utilizó el ROI del pulmón completo (Figura 4.9). Tres animales se ventilaron y se midieron (adquisición de imágenes) a las cuatro condiciones de ventilación mencionadas en la sección anterior. En la Figura 5.10 se muestra el valor medio y la desviación estándar del área pulmonar (cm²) para los tres animales, así como la comparación por pares y el nivel de significación (*). Los resultados estadísticos realizados con la prueba t de Student no muestran diferencias significativas en el área pulmonar cuando se comparan imágenes adquiridas a EEV, EEV-12mbar y EEV-22mbar. Jacob *et al.* (12) observaron diferentes presiones a EEP (end expiration pressure) entre animales como consecuencia de la diferente compliancia pulmonar. Aunque este hecho puede ocurrir también en nuestro caso cuando se mide a EEV, no se ve reflejado en el estudio estadístico ya que nosotros comparamos entre diferentes condiciones para el mismo animal (comparación intra-sujeto) y no entre animales.

5.7 Comparación de ADC entre animales sanos y enfisematosos

Hasta ahora solo se había experimentado con animales sanos. Sin embargo, en este apartado se compararán los datos de ADC obtenidos de un grupo de animales control (N = 3)

con otro grupo al que se le instiló elastasa en el pulmón completo (N = 6) según fue descrito en el **Capítulo 4.2**. La adquisición de las imágenes se llevo a cabo ocho semanas después de la instilación de la elastasa. Al igual que las **Secciones 5.5 y 5.6**, las condiciones de ventilación a las que se obtuvieron las imágenes fueron: EI BH-22mbar, EI BH-12mbar, EEV-22mbar and EEV-12mbar. Para este experimento no se aplicó ningún PEEP. Los animales respiraron aire a volumen tidal y se aplicó una dosis de HP^3He puro tanto para los tres prelavados como para la apnea (adquisición de la imagen). La media de los valores de ADC y la desviación estándar para cada condición de ventilación y para los dos grupos de animales se muestran en la **Figura 5.11**. Para mayor claridad, se ha asignado una letra a cada columna de la figura que serán usadas para la comparación estadística entre pares, cuyos resultados están resumidos en la **Tabla 5.2**. La prueba t de Student se aplicó en todos los casos, teniendo en cuenta la paridad de las parejas estudiadas.

El resultado más importante que se obtuvo de este estudio, fue la falta de diferencias significativas entre animales control y animales inducidos con elastasa, a tres de las cuatro condiciones de ventilación (EI BH-12mbar, EEV-22mbar and EEV-12mbar). En las medidas a EI BH-22mbar se obtuvo un valor de $P = 0.0498$ al comparar el grupo control con el inducido con elastasa. Se encontraron diferencias significativas entre medidas a EI BH y EEV para cada grupo animal.

5.8 Discusión y Conclusiones

Los estudios de reproducibilidad de las medidas de ADC a diferentes condiciones de ventilación constituyen un factor importante a tener en cuenta. Los resultados obtenidos mostraron una baja variabilidad ($CV < 2\%$) intra-individual, que se puede considerar como una consecuencia de la aplicación de condiciones de ventilación mecánica no agresivas y del relativamente corto tiempo de exposición al que los animales estuvieron sometidos a la ventilación mecánica. El coeficiente de variación alcanzó el 5 % cuando se analizaron los animales por grupo, mostrando una variabilidad inter-sujetos mayor que la variabilidad intra-sujetos. Ciertos parámetros fisiológicos, tales como la compliancia pulmonar y el volumen residual funcional, se cree que sean la causa de la variabilidad inter-sujetos siendo mencionada también por otros autores, incluso en grupos de animales sanos (**13, 14**).

Se observó que la aplicación de los prelavados no fue eficiente para mejorar el SNR en las imágenes. Esto se podría atribuir al bajo número de prelavados (3 prelavados) usados en nuestros experimentos, a la despolarización del gas durante su almacenamiento en la bolsa de He ó a ambos factores a la vez. Sin embargo, un mayor número de prelavados hubiera requerido el consumo de una mayor cantidad de HP-gas y un mayor tiempo en la bolsa. Aunque esta maniobra no contribuyó a mejorar la calidad de las imágenes, reveló la dependencia de ADC con el número de prelavados. Rudersford **(1)** calculó que con un número de prelavados superior a 9 se alcanzaría el valor del coeficiente de auto-difusión del ^3He . Es decir, esta maniobra de los prelavados sería suficiente para intercambiar completamente el aire que había dentro del pulmón previo a los prelavados por HP^3He .

Al igual que con el número de prelavados, con la aplicación de un PEEP se observaron cambios en el ADC cuando se adquiría la imagen a una presión fija. Se vio una disminución clara del ADC al aumentar los valores de PEEP. La introducción del PEEP se puede considerar como un incremento del volumen residual del pulmón, que previene que la presión decaiga hasta la atmosférica al final de la espiración. Cuando la medida es a una presión fija de El BH, la cantidad de HP-gas que se usa para inflar el pulmón hasta esta presión, es menor a mayor PEEP. En el caso particular de ventilar a los animales con aire, el PEEP aumentará no solo la cantidad de este gas, sino también su concentración en el pulmón. Ya que el coeficiente de difusión del aire es menor que el del helio, cabe esperar que los pulmones que contienen una mayor concentración de aire, muestren coeficientes de difusión más pequeños y por lo tanto, menores valores de ADC. Esta hipótesis también podría explicar el efecto del número de prelavados en el ADC. A mayor número de prelavados, mayor volumen de aire es intercambiado por helio (mayor coeficiente de difusión) y por consiguiente valores más altos de ADC.

La misma hipótesis se podría aplicar en el caso de comparar animales sanos y animales inducidos con elastasa. Estos últimos desarrollan un enfisema que incrementa tanto el tamaño alveolar como el volumen residual. Se espera que un mayor tamaño alveolar conlleve un valor mayor de ADC, pero por otro lado, el incremento del volumen residual (similar situación a la aplicación de un PEEP) causaría una disminución de ADC. Ya que estos dos factores son opuestos, los resultados comparativos entre animales sanos y con enfisema pueden ser mal interpretados, reduciendo las diferencias e incluso invirtiéndolas, tal y como

se puede concluir de los resultados mostrados en este capítulo. Varios estudios en animales **(12, 15, 16)** y en humanos **(11, 17-19)** han puesto de manifiesto las diferencias de ADC entre tejidos sanos y tejidos enfisematosos. Por ello, que el ADC se haya aceptado a nivel mundial como parámetro para detectar enfisema, sin embargo, también se ha reconocido que el ADC es afectado por ciertos parámetros, mostrando la importancia de tener en cuenta estos otros factores para poder considerar el ADC como un biomarcador fiable.

La validación de esta hipótesis será el objetivo principal del siguiente capítulo. Así mismo se describirá un nuevo método de ventilación que minimiza el efecto de la concentración de gases en el pulmón en las medidas de ADC.

Chapter 6

Effect of gases concentration on ADC measurements: comparison between two ventilation methods

Efecto de la concentración de gases en la medida de ADC: comparación entre distintos métodos de ventilación

Chapter 6

6.1 Different gases concentrations and lung volumes

6.2 Gas mixture calculation and proposed ventilation method: VOHeM

6.3 Comparison between proposed (VOHeM) and standard method

6.4 Discussion and Conclusions

Introduction

It has been found that the ADC is highly affected by certain physiological parameters such as posture (1, 2), macroscopic motion like the beating heart (3) and the degree of lung inflation (4, 5), and acquisition parameters, such as the diffusion weighting (including b-values, diffusion time and gradient pulse shape) (6). Moreover, in the previous chapter, the dependency of ADC on other two parameters has been shown: the number of prewashes and PEEP level. Yablonskiy *et al.* (7) have recently suggested the concentration of the hyperpolarized gas used for lung inflation as a possible contribution of the subjective bias in estimation of ADC. Therefore proper control of all these parameters has become mandatory in order to extract reliable ADC values from the measurements.

In addition, we have shown that ADC measurements did not distinguish between control and emphysematous lung tissue in any of the four ventilation conditions at which the animals were imaged when the standard ventilation method was used. This method utilizes gases with different diffusion coefficients for ventilation (air) and imaging (HP^3He), thus we hypothesize that the application of both the prewashes and PEEP vary the relative concentration of these gases in the lung. The intra-diffusion coefficient (8, 9) for the NMR-resonant species of a mixture can be quite sensitive to the concentration of all the components (10). Therefore, the ADC values would depend on both the gas delivered to the lung for imaging and the residual gas in the lung from breathing, as well as on the relative amounts of these two gases in the final mixture.

In this chapter we investigate the effect of the gas mixture composition in the lung on the ADC values, describing in detail how the application of a PEEP is used to vary the gases concentration in the lung. Moreover, we will develop a ventilation method that uses two

different gas mixtures (one for ventilating and one for MRI data acquisition) with similar diffusion coefficients. The purpose of this novel method, named VOHeM (Ventilation with Oxygen and Helium Mixture) was to minimize the dependency of ADC on the residual gas volume.

In this Chapter the proposed method will be compared with the standard ventilation method in healthy animals in order to prove its efficacy.

6.1 Different gases concentrations and lung volumes

In order to compare measurements among animals, either the pressure or the volume at which imaging is performed must be fixed to a certain value. The choice of imaging at a fixed pressure allows us to apply any PEEP while keeping the same value of EI BH pressure (**Figure 6.1**). This figure shows the change of the relative lung volumes as an effect of applying three different PEEP values (no PEEP, low PEEP and high PEEP). Conversely, the application of a PEEP when imaging at a fixed incoming volume would produce a shift to higher EI BH pressures (**Figure 6.2**). In this case, a higher PEEP value means higher lung inflation. Therefore, fixed pressure measurements at different PEEP values can be used to modify the gas concentration in the lung. Since the PEEP can be considered as residual volume, the higher the PEEP, the higher the residual volume (RV) and the smaller the incoming gas volume (HP-gas).

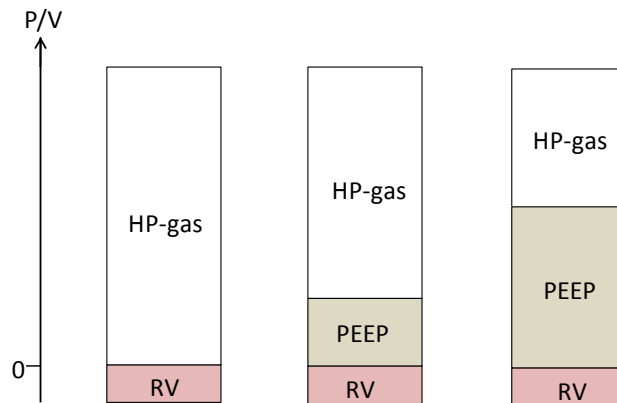


Figure 6.1

Scheme of lung volumes and/or pressures when imaging at a fixed EI BH pressure and at three different PEEP levels. The application of a PEEP increases the volume which can be considered as residual volume in the lung and reduces the incoming gas volume while keeping the same EI BH pressure.

Esquema de volúmenes y/o presiones del pulmón cuando se adquiere la imagen a una presión fija de EI BH para tres valores de PEEP diferentes. La aplicación de un PEEP incrementa el volumen que puede ser considerado como volumen residual y reduce el volumen de gas entrante manteniendo la misma presión EI BH

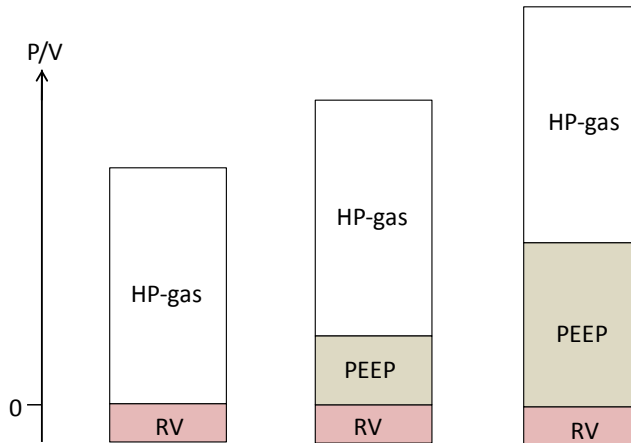


Figure 6.2

Scheme of lung volumes and/or pressures when imaging at a fixed incoming volume and at three different PEEP levels. The application of a PEEP shifts the EI BH pressure to a higher value, increasing the volume which can be considered as residual volume while keeping the incoming gas volume.

Esquema de volúmenes y /o presiones del pulmón cuando se adquiere la imagen a un volumen fijo aplicado para tres valores de PEEP diferentes. La aplicación de un PEEP conlleva a un valor mayor de la presión EI BH, incrementando el volumen considerado como residual mientras que se mantiene el volumen de gas entrante.

In the case of ventilating animals with the standard ventilation method, the residual gas is room air while the incoming gas is pure HP-³He. As mentioned before, these two gases have different diffusion coefficients, D , therefore the diffusion coefficient of the final gas mixture might vary depending on the applied PEEP (cases 1-3 in **Figure 6.3**). Since $D(\text{HP}^3\text{He}) > D(\text{air})$, the diffusion coefficient in Case 1 would be higher than in Case 2 and the one in Case 2 higher than in Case 3. **Figure 6.3** corresponds to **Figure 6.1** but indicating the utilized gases in the particular case of using the standard method.

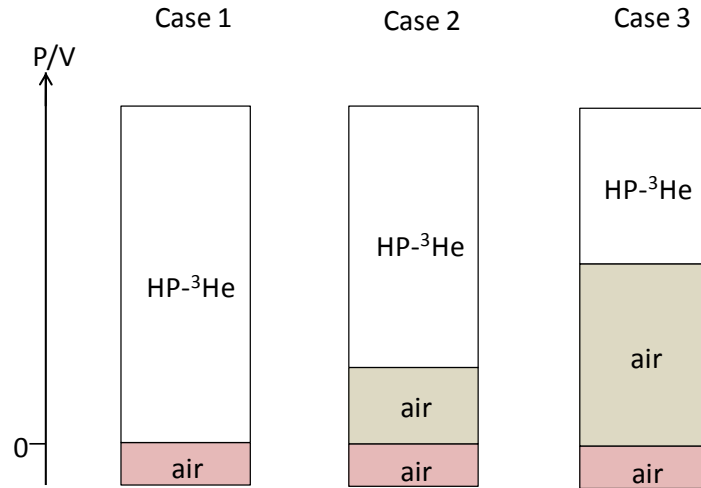


Figure 6.3

Scheme of gas mixture composition and gases concentrations at three different PEEP levels in the standard ventilation method (fixed EI BH)

Esquema de la composición de la mezcla de gas y la concentración de gases a tres valores de PEEP diferentes en el método de ventilación estándar (EI BH fija)

6.2 Gas mixture calculation and proposed ventilation method: VOHeM

The main goal of this section is to define the characteristics of a new ventilation method which minimizes the effect of gases' concentration on ADC measurements. The principal idea of the new method consisted of ventilating the animals with two different gas mixtures, before and during MRI data acquisition, with the simple requirement that both mixtures must have a free intra-diffusion coefficient as similar as possible. In order to have $D(\text{Case 1}) \sim D(\text{Case 2}) \sim D(\text{Case 3})$, the requirement of $D(\text{Mixture 1}) \sim D(\text{Mixture 2})$ must be accomplished (**Figure 6.4**). Mixture 1 and Mixture 2 are the ventilation and imaging mixtures, respectively. The composition of these two mixtures has some restrictions or limitations. Firstly, the ventilation mixture must contain at least 21% of oxygen to ensure good ventilation conditions to the animals. Thus, the rest of this mixture (79%) is completed with ^4He which has a similar molecular weight compared to HP^3He . Secondly, the imaging mixture should contain as much HP^3He as possible to obtain the best SNR. The other gas used in this mixture must not have an effect on the polarization of the HP^3He . Nitrogen was the proposed candidate, since it has similar molecular weight and diffusion properties compared to oxygen, thus it can replace the oxygen in the imaging mixture. Moreover, N_2

has already been used in most of the human studies to mix it with HP^3He in order to reduce the consumed HP-gas (11, 12).

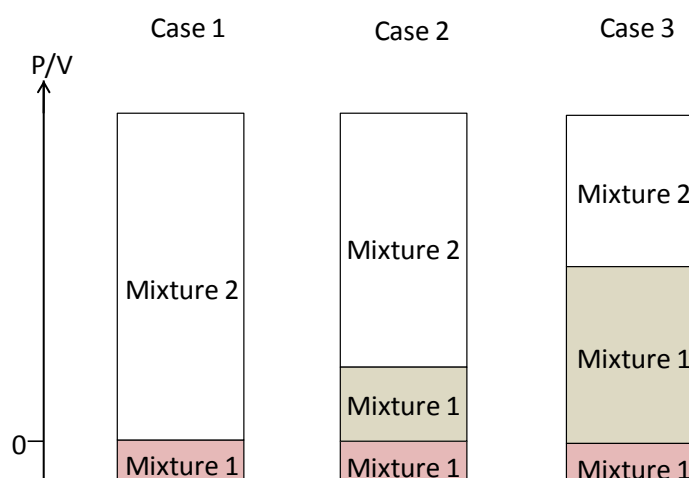


Figure 6.4

Scheme of gas mixture composition and gases concentrations at three different PEEP levels and at fixed EI BH. In the proposed ventilation method, Mixture 1 (ventilation mixture) consisted of O_2 and 4He and Mixture 2 (imaging mixture) of N_2 and HP^3He

Esquema de la composición de la mezcla de gas y la concentración de gases a tres valores de PEEP diferentes y a EI BH fija. En el método de ventilación propuesto, la Mezcla 1 (mezcla de ventilación) consiste en O_2 y 4He , mientras que la Mezcla 2 (adquisición de imagen) está constituida por N_2 y HP^3He

Since the percentage of gases in Mixture 1 is known (21% O_2 and 79% 4He), the diffusion coefficient for this mixture can be calculated using equation 3.2. The obtained value ($1.583 \text{ cm}^2/\text{s}$) is shown in the first row in **Table 6.1**. The rest of the rows of the table show the calculated diffusion coefficient for different concentrations of HP^3He and N_2 (Mixture 2). It is seen that mixing 77% of HP^3He and 23% N_2 yields the most similar diffusion coefficient compared to the one of Mixture 1. Due to the gases utilized in the ventilation mixture the proposed method was named VOHeM (ventilation with oxygen and helium mixture).

P (^3He) (bar)	P (^4He) (bar)	P (N_2) (bar)	P (O_2) (bar)	Free Diffusion Coefficient (cm^2/s)
0	0.79	0	0.21	1.5836026
0.75	0	0.25	0	1.5465876
0.76	0	0.24	0	1.5633707
0.77	0	0.23	0	1.5805220
0.78	0	0.22	0	1.5980537
0.79	0	0.21	0	1.6159788

Table 6.1

Calculation of diffusion coefficient for Mixture 1 and for different gases concentrations for Mixture 2. The concentrations of the two chosen mixtures for the proposed ventilation method are marked in bold.

Cálculo de los coeficientes de difusión para la Mezcla 1 y para diferentes concentraciones de gases para la Mezcla 2. En negrita están marcadas las concentraciones de las dos mezclas escogidas para el método propuesto de ventilación.

6.3 Comparison between proposed (VOHeM) and standard method

In total 29 animals were studied. They were ventilated at a breathing rate of 60 breaths per minute and at tidal volume of ~ 6 mbar of pressure. After the three pre-washes an EI BH of ~ 23 mbar was applied. Experiments were carried out using the two different ventilation methods: standard (air and HP^3He for ventilation and imaging mixtures, respectively) and VOHeM ($\text{O}_2/{}^4\text{He}$ and $\text{N}_2/\text{HP}^3\text{He}$ for ventilation and imaging mixtures, respectively). Thirteen animals were ventilated with the standard method. No PEEP was used in six of these animals whereas PEEP5 was applied to the other seven animals. Fourteen animals were measured using the VOHeM method at PEEP0 (n=5), PEEP5 (n=5) or PEEP10 (n=4). The left two animals were measured under both ventilation methods to perform intra-subject comparisons.

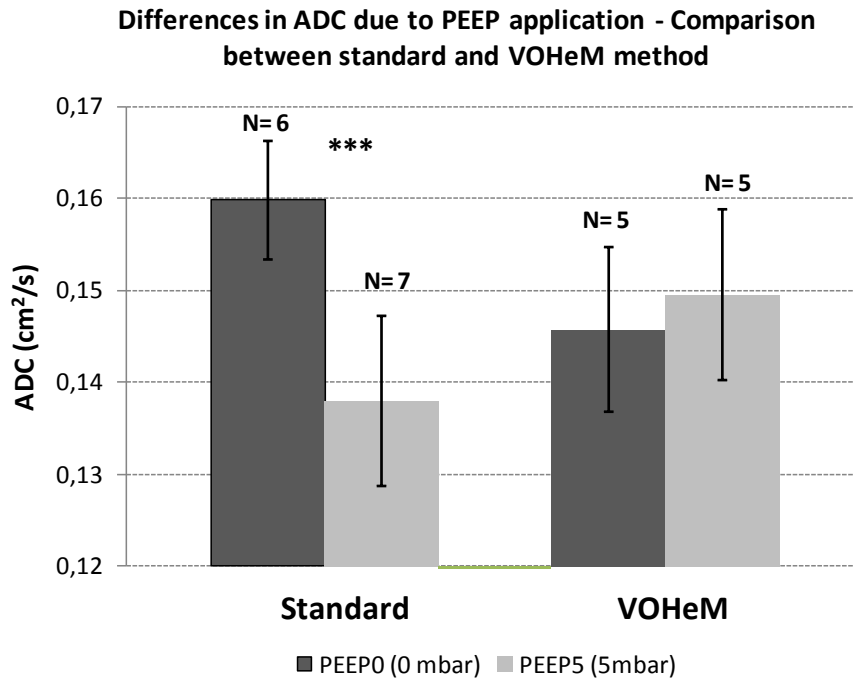


Figure 6.5

Mean ADC and standard deviation at two different PEEP levels for the standard and VOHeM method. Highly significant differences between PEEP0 and PEEP5 were found when using standard method. The differences disappeared when VOHeM method was used.

(***) $p < 0.001$

Media de ADC y desviación estándar a dos valores de PEEP diferentes para el método de ventilación estándar y el método VOHeM. Se observan diferencias muy significativas entre PEEP0 y PEEP5 cuando se usa el método estándar mientras que estas diferencias desaparecen en el método VOHeM.

(***) $p < 0.001$

Figure 6.5 summarizes the ADC measurements using both ventilation methods with two applied PEEP values. The ADC data acquired at PEEP10 for the animals ventilated with VOHeM is not shown in this figure due to the lack of the corresponding data for the other method. However, the pair-wise comparisons and statistics including this data are shown in **Table 6.2**. No significant differences were found in any comparison in VOHeM method, considering the three PEEP levels.

	PEEP [mbar]			
Ventilation strategy	Group 1	Group 2	ADC mean difference between Group 2 and Group 1 (cm ² /s)	P value
Standard	PEEP0 (n=6)	PEEP5 (n=7)	-0.02184	0.0005
VOHeM	PEEP0 (n=5)	PEEP5 (n=5)	0.00415	0.5237
	PEEP0 (n=5)	PEEP10 (n=4)	-0.00677	0.1959
	PEEP5 (n=5)	PEEP10 (n=4)	-0.01093	0.0699

Table 6.2

Summary of the pair-wise comparisons (ADC mean differences and P value) between animal groups measured at different levels of PEEP in standard and VOHeM method.

Resumen de los resultados estadísticos (diferencia de las medias de ADC y valor de P) de los grupos animales medidos a distintos valores de PEEP, tanto con el método estándar como con el método VOHeM

Whilst the ADC measured with the standard method shows significant statistical differences ($p = 0.0005$) between PEEP0 and PEEP5, the ADC measured using VOHeM does not show any difference among the three PEEP values. As suggested before, the different ADC values obtained with each PEEP using the standard method are due to the differences in residual gas volume. By using VOHeM method the differences in ADC are minimal due to the fact that intra-diffusion coefficient of the mixture in the lung is similar regardless of the gases concentration. The same effect is clearly seen in **Figure 6.6**. This figure shows the relative ADC differences between PEEP0 and PEEP5 normalized to the ADC value obtained at PEEP0 for two healthy animals (C1 and C2) measured under the two ventilation methods.

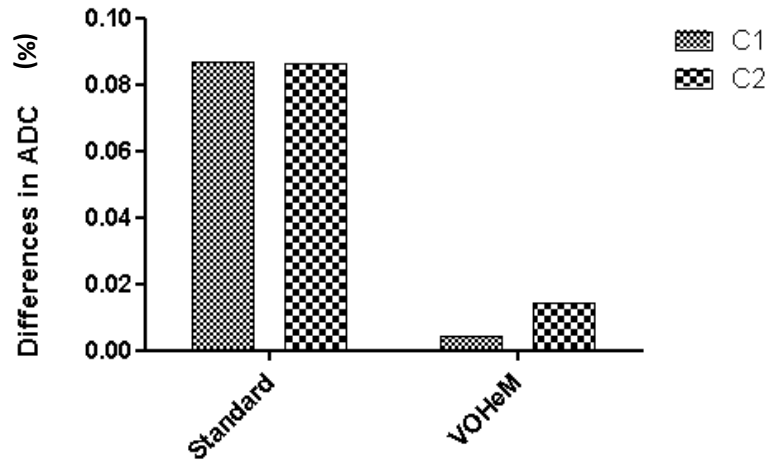


Figure 6.6

Relative ADC differences (%) between PEEP0 and PEEP5 normalized to the ADC value obtained at PEEP0 for two healthy animals (C1 and C2) measured under the two ventilation methods

Diferencias relativas de ADC (%) entre PEEP0 y PEEP5 normalizadas al valor de ADC obtenido a PEEP0 para dos animales sanos (C1 y C2), medidos usando los dos métodos de ventilación

6.4 Discussion and Conclusions

When the standard ventilation method is applied in a single breath-hold measurement, the differences between ADC values at PEEP0 and PEEP5 reflect the influence of the amount of residual gas in the lung.

Our interest in this work was to obtain a simplified, reliable and reproducible in-vivo ADC measurement, independent of the relative amounts of incoming and residual gas in the lung by using the minimum possible amount of hyperpolarized gas (single breath-hold). Thus, the proposed ventilation method, VOHeM (ventilation with oxygen-helium mixture), was specially designed to minimize this dependency. VOHeM consisted of ventilating the animals with two different gas mixtures, before and during MRI data acquisition, with the simple requirement that both mixtures must have similar free intra-diffusion coefficients. Moreover, it was necessary to provide an appropriate oxygen concentration to the animals (21%). Thus, we ensure, firstly that animals are correctly ventilated and secondly that the effect of different gas concentrations on diffusion coefficient and therefore on ADC are minimized. Moreover, the gas used in the mixture with HP-³He must neither be harmful for

the animal nor have any effect on the polarization of the HP-gas. Additionally, its molecular weight must be similar to O₂. N₂ fulfils all these requirements. Other authors have added N₂ or ⁴He to the HP-gas, mainly with the idea of reducing the amount of HP-gas required for the experiment (11, 12). In summary, the chosen gas mixtures were 21% of O₂ and 79% of ⁴He for the ventilation mixture and 23% of N₂ and 77% of HP³He for the imaging mixture. The free diffusion coefficient of these two mixtures were similar and with a value of 1.58 cm²/s. The application of this method which combines these two gas mixtures is perfectly feasible in humans.

The success of the VOHeM was graphically represented in both Figure 6.5 and 6.6. By using this method, measurements at two different PEEP values lead to minimal differences in ADC, demonstrating the absence of any residual gas effect. This clearly identifies the problem with the gas concentration in the lung during the image acquisition. Thus, these results highlight the importance of the ventilation method chosen and how essential it is to control the composition of the gas mixture at the time of image acquisition when measuring ADC.

Any application of ADC measurements in animals should pay attention to the residual gas factor, since some diseases are characterized by different lung inspiratory and residual capacities (13). A complete control of the concentration of gases and ventilation/gas delivery protocol is important in order to use ADC as a reliable biomarker for the detection and progression of diseases, such as emphysema. Some other authors performed different maneuvers in order to minimize this dependency. Chen *et al.* (14) alternated breaths of air/isoflurane and HP gas, using multiple breaths for each MRI acquisition for gas homogenization. Peces-Barba *et al.* (15) used a post mortem animal model employing a similar gas mixture for all animals (an inspiratory capacity of 5 ml of ³He in N₂). Dugas *et al.* (12) acquired the data over multiple breaths and scanned one line of K-space for every slice, per breath. Thus, they had to control that the lungs return to a consistent level of inflation with each breath.

This method will be applied in control and elastase-treated animal in order to detect differences in ADC measurements between healthy and emphysematous tissue in a single breath-hold measurement. The efficacy and importance of VOHeM method will be shown in the next chapter.

References

1. Evans A, McCormack DG, Ouriadov A, Etemad-Rezai R, Santyr GE, Parraga G. Anatomical Distribution of ^3He Apparent Diffusion Coefficients in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Magn Reson Imaging* 2007;26:1537-1547.
2. Fichele S, Woodhouse N, Swift AJ, Said Z, Paley MN, Kasuboski L, Mills GH, van Beek EJ, Wild JM. MRI of helium-3 gas in healthy lungs: posture related variations of alveolar size. *J Magn Reson Imaging* 2004;20(2):331-335.
3. Schreiber WG, Morbach AE, Stavngaard T, Gast KK, Herweling A, Sogaard LV, Windirsch M, Schmiedeskamp J, Heussel CP, Kauczor HU. Assessment of lung microstructure with magnetic resonance imaging of hyperpolarized Helium-3. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;148(1-2):23-42.
4. Diaz S., Casselbrant I., Piitulainen e., Pettersson G., agnusson P., Peterson B., Wollmer P., Leander P., Ekberg O., Akeson P. Hyperpolarized ^3He Apparent Diffusion Coefficient MRI of the Lung: Reproducibility and Volume Dependency in Healthy Volunteers and Patients With Emphysema. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:763-770.
5. Waters B, Owers-Bradley J, Silverman M. Acinar Structure in Symptom-free Adults by Helium-3 Magnetic Resonance. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:847-851.
6. Gierada DS, Woods JC, Bierhals AJ, Bartel ST, Ritter JH, Choong CK, Das NA, Hong C, Pilgram TK, Chang YV, Jacob RE, Hogg JC, Battafarano RJ, Cooper JD, Meyers BF, Patterson GA, Yablonskiy DA, Conradi MS. Effects of diffusion time on short-range hyperpolarized (^3He) diffusivity measurements in emphysema. *J Magn Reson Imaging* 2009;30(4):801-808.
7. Yablonskiy DA, Sukstanskii AL, Woods JC, Gierada DS, Quirk JD, Hogg JC, Cooper JD, Conradi MS. Quantification of lung microstructure with hyperpolarized ^3He diffusion MRI. *J Appl Physiol* 2009;107(4):1258-1265.

8. HIRSCHFELDER JO, BIRD RB, SPOTZ EL. The transport properties of gases and gaseous mixtures. *Chem Rev* 1949;44(1):205-231.
9. HIRSCHFELDER JO, Curtis CF, BIRD RB. *Molecular theory of gases and liquids*. Wiley, New York; 1954.
10. Bidinosti CP, Choukeife J, Nacher PJ, Tastevin G. In vivo NMR of hyperpolarized ^3He in the human lung at very low magnetic fields. *J Magn Reson* 2003;162(1):122-132.
11. Jacob RE, Minard KR, Laicher G, Timchalk C. 3D ^3He diffusion MRI as a local in vivo morphometric tool to evaluate emphysematous rat lungs. *J Appl Physiol* 2008;105(4):1291-1300.
12. Dugas JP, Garbow JR, Kobayashi DK, Conradi MS. Hyperpolarized (^3He) MRI of mouse lung. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1310-1317.
13. West JB. *Pulmonary Pathophysiology: the essentials*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
14. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of ^3He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
15. Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J, Cremillieux Y, Rodriguez I, Dupuich D, Callot V, Ortega M, Rubio Arbo ML, Cortijo M, Gonzalez-Mangado N. Helium-3 MRI diffusion coefficient: correlation to morphometry in a model of mild emphysema. *Eur Respir J* 2003;22(1):14-19.

Capítulo 6: Efecto de la concentración de gases en la medida de ADC: comparación entre dos métodos de ventilación distintos

6.1 Diferentes concentraciones de gases y volúmenes pulmonares

6.2 Cálculo de la mezcla de gases y método de ventilación propuesto: VOHeM

6.3 Comparación entre el método propuesto (VOHeM) y el método estándar

6.4 Discusión y Conclusiones

Introducción

La determinación del ADC está afectada en gran medida por algunos parámetros fisiológicos como: postura del sujeto **(1, 2)**, latido del corazón **(3)** y grado de inflación del pulmón **(4, 5)**, pero también por otros relacionados con la difusión (valor de b , tiempo de difusión y forma de los gradientes) **(6)**. En el capítulo anterior se mostró la dependencia del ADC con otros dos parámetros: el número de prelavados y el valor de PEEP utilizado. Yablonskiy *et al.* **(7)** sugirieron incluso la posible contribución, que en la estimación del ADC tendría la concentración del gas hiperpolarizado usado en la inflación del pulmón. Es por ello, que un buen control de estos parámetros sea imprescindible para la obtención de valores fiables de ADC.

Además en el capítulo anterior se mostró que las medidas de ADC no distinguían entre tejido pulmonar sano y enfisematoso a ninguna de las cuatro condiciones de ventilación a las que se adquirieron las imágenes, al aplicar el método de ventilación estándar. Este método utiliza gases para la ventilación (aire) y para la imagen (HP^3He) con diferentes coeficientes de difusión, por lo que tanto la aplicación de prelavados como del PEEP variaba la concentración relativa de estos gases en el pulmón. El coeficiente de intra-difusión **(8, 9)** de la especie resonante de una mezcla de gases es sensible a la concentración de sus componentes **(10)**. Así, los valores de ADC dependerán tanto del gas introducido para la adquisición de la imagen como del gas residual en el pulmón procedente de la respiración, y además de la proporción de ambos gases en la mezcla final.

En este capítulo se estudiará el efecto de la composición de la mezcla de gases en el pulmón sobre los valores de ADC, describiendo en detalle cómo se usa la aplicación de un PEEP para variar las concentraciones de los gases en el pulmón. Además, se desarrollará un método de

ventilación que usa dos mezclas diferentes de gases (una para ventilación y otra para la adquisición de la imagen) con similar coeficiente de difusión. El nuevo método propuesto, denominado VOHeM (ventilación con mezcla de Oxígeno y Helio) tuvo como objetivo minimizar la dependencia del ADC con el volumen de gas residual.

En este capítulo, el método de ventilación VOHeM se comparará con el método estándar en animales sanos con el fin de comprobar su eficacia.

6.1 Diferentes concentraciones de gases y volúmenes pulmonares

Con objeto de comparar medidas de ADC entre animales, se debe fijar ó bien la presión ó el volumen pulmonar a un determinado valor durante la adquisición de la imagen. Escoger una presión fija nos permite aplicar cualquier PEEP mientras se mantiene el mismo valor de El BH. La **Figura 6.1** muestra el cambio en los volúmenes pulmonares como efecto de la aplicación de tres valores de PEEP diferentes (ningún PEEP, bajo PEEP y elevado PEEP). Por el contrario, la aplicación de un PEEP cuando se adquiere la imagen a un volumen de entrada fijo produciría un desplazamiento de la presión El BH hacia valores más altos (**Figura 6.2**). En este caso, un valor más elevado de PEEP significa mayor inflación pulmonar. Por lo tanto, para modificar la concentración de gas en el pulmón se usarán diferentes valores de PEEP en medidas a presión fija. Ya que el PEEP se puede considerar como volumen residual, a mayor PEEP, mayor volumen residual (RV) y menor el volumen de gas hiperpolarizado que entra en el pulmón.

En el caso de ventilar los animales con el método estándar, el gas residual es aire, mientras que el gas entrante es HP^3He puro. Como se ha mencionado anteriormente, estos dos gases tienen diferentes coeficientes de difusión, D , así el coeficiente de difusión de la mezcla final de gas, variará dependiendo del PEEP aplicado (casos 1-3 en **Figura 6.3**). Puesto que, $D(\text{HP}^3\text{He}) > D(\text{aire})$, el coeficiente de difusión en el Caso 1 sería mayor que en el Caso 2 y éste mayor que en el Caso 3.

6.2 Cálculo de la mezcla de gases y método de ventilación propuesto: VOHeM

El objetivo principal de esta sección es definir las características de un nuevo método de ventilación que minimice los efectos de la concentración de gases en las medidas de ADC. La

idea principal del nuevo método consiste en ventilar los animales con dos mezclas de gases diferentes, antes y durante la adquisición de datos de MRI, con el único requisito que ambas mezclas tengan el mismo coeficiente de intra-difusión ó al menos que sean lo más similar posible. Con objeto de tener que $D(\text{Caso 1}) \sim D(\text{Caso 2}) \sim D(\text{Caso 3})$ se debe cumplir el requisito de que $D(\text{Mezcla 1}) \sim D(\text{Mezcla 2})$ (**Figura 6.4**). La Mezcla 1 y la Mezcla 2 son las mezclas usadas para la ventilación y la adquisición de imagen, respectivamente. La composición de estas dos mezclas presenta algunas limitaciones. En primer lugar, la mezcla de ventilación debe contener al menos 21 % de oxígeno para asegurar buenas condiciones de ventilación a los animales. El resto de esta mezcla (79 %) se completa con ^4He , que tiene un peso molecular similar al HP^3He . En segundo lugar, la mezcla de adquisición de imagen debería contener tanto HP^3He como sea posible para obtener una mejor relación señal ruido (SNR). El otro gas usado en esta mezcla no debe tener efecto en la polarización del HP^3He . El N_2 fue pues el gas propuesto, ya que además tiene similar peso molecular y propiedades de difusión que el oxígeno, pudiéndole así reemplazar en la mezcla de imagen. El N_2 ya se ha utilizado en mezclas con HP^3He en varios estudios realizados en humanos, cuyo objetivo era el de reducir el consumo de gas hiperpolarizado (HP-gas) (**11, 12**).

Una vez conocido el porcentaje de gases de la Mezcla 1 (21% O_2 y 79% ^4He) se puede calcular su coeficiente de difusión según la **Ecuación 3.2**. El valor obtenido ($1.583 \text{ cm}^2/\text{s}$) se expone en la primera fila de la **Tabla 6.1**. El resto de filas muestran el cálculo de los coeficientes de difusión para diferentes concentraciones de HP^3He y N_2 (Mezcla 2). Se puede ver que la mezcla de 77 % de HP^3He y 23 % de N_2 presenta el coeficiente de difusión más similar al de la Mezcla 1. Así estas dos Mezclas serán las usadas en el método de ventilación propuesto por nosotros y que hemos denominado VOHeM (Ventilation with Oxygen and Helium Mixture).

6.3 Comparación entre el método propuesto (VOHeM) y el método estándar

Se estudió un total de 29 animales que se ventilaron a razón de 60 respiraciones por minuto y a un volumen tidal de ~ 6 mbares de presión. Después de tres prelavados se aplicó una apnea a El BH de ~ 23 mbares de presión durante la cual se adquirió la imagen.

Los experimentos se llevaron a cabo usando dos métodos de ventilación diferentes: el método estándar (aire y HP^3He puro, para ventilación y adquisición de imágenes,

respectivamente) y el método VOHeM (mezclas de $O_2/^4He$ y N_2/HP^3He para ventilación y adquisición de imágenes, respectivamente).

Se ventilaron trece animales con el método estándar. No se usó ningún PEEP en seis de estos animales, mientras que a los otros siete, se les aplicó un PEEP de 5 mbares (PEEP5). Catorce animales se midieron usando el método VOHeM a PEEP0 (n=5), PEEP5 (n=5) y a PEEP10 (n=4). Los dos animales restantes se midieron aplicando ambos métodos de ventilación para poder establecer comparaciones intra-sujetos.

En la **Figura 6.5** se representan las medidas de ADC usando ambos métodos de ventilación a dos valores de PEEP aplicados. Mientras que las medidas de ADC con el método estándar presentan diferencias estadísticas significativas ($P = 0.0005$) entre PEEP0 y PEEP5, el ADC medido usando el método VOHeM no muestra ninguna diferencia entre los dos valores de PEEP. Los valores obtenidos al aplicar un PEEP de 10 mbares con el método VOHeM no se muestran en esta figura ya que no se obtuvieron datos a este PEEP con el método estándar, y por lo tanto no se pudieron comparar. Las comparaciones por pares y datos estadísticos incluyendo los datos obtenidos con PEEP10 se presentan en la **Tabla 6.2**.

Como se sugirió anteriormente, los diferentes valores de ADC obtenidos con cada PEEP, usando el método estándar se deben a las diferencias en el volumen de gas residual. Con el método VOHeM las diferencias en ADC son mínimas, debido a que el coeficiente de intra-difusión de la mezcla en el pulmón es el mismo independientemente de la concentración de gases. Este efecto se ve claramente en la **Figura 6.6**. Esta figura muestra las diferencias relativas del ADC (en porcentaje) entre PEEP0 y PEEP5 normalizado al valor de ADC obtenido a PEEP0, para dos animales sanos (C1 y C2) medidos bajo los dos métodos de ventilación.

6.4 Discusión y Conclusiones

Cuando las imágenes son obtenidas durante la aplicación de una apnea usando el método de ventilación estándar, las diferencias entre los valores de ADC obtenidos a PEEP0 y PEEP5 reflejan la influencia del gas residual existente en el pulmón. Sin embargo, con el método propuesto por nosotros, VOHeM, las diferencias en ADC a distintos valores de PEEP desaparecen, poniendo de manifiesto el efecto de la concentración de los gases en la determinación de ADC.

Nuestro objetivo en este trabajo de investigación, se basaba en obtener medidas fiables y reproducibles de ADC *in vivo*, independientes del gas residual y del gas entrante en el pulmón, usando la mínima cantidad posible de gas hiperpolarizado (adquisición durante una sola apnea). Por ello se propuso un método de ventilación, VOHeM, que fue especialmente preparado para minimizar esta dependencia. VOHeM consiste en ventilar a los animales con dos mezclas de gases (uno para la ventilación y otro para la adquisición de imágenes) con similar coeficiente de difusión. Además fue necesario suministrar a los animales una concentración de oxígeno apropiada (21 %). Con todo ello garantizábamos, en primer lugar, que los animales fueran correctamente ventilados y en segundo lugar, lograríamos minimizar el efecto que las diferentes concentraciones de gas tienen sobre los coeficientes de difusión y por lo tanto sobre las medidas de ADC. Por otro lado, el gas usado en la mezcla con HP³He debería tener una masa molecular similar a la del oxígeno y no producir ningún efecto sobre la polarización del gas hiperpolarizado. El gas escogido que cumplía todos estos requisitos fue N₂. Varios autores han usado tanto N₂ como ⁴He para mezclar con el gas hiperpolarizado con el objetivo de reducir el consumo de este gas (**11, 12**). En resumen, las mezclas usadas en el método fueron: 21% de O₂ y 79% de ⁴He para el gas de ventilación y 23% de N₂ y 77% de HP³He para el gas usado en la adquisición de la imagen. Los coeficientes de difusión libre para estas dos mezclas de gases fueron similares y con un valor de 1.58 cm²/s. Otra ventaja de este método es que es perfectamente aplicable en humanos.

La validez del método VOHeM queda representada gráficamente en las **Figuras 6.5 y 6.6**. Con la utilización de este método, se minimizan las diferencias en las medidas de ADC al aplicar diferentes valores de PEEP, demostrando claramente la ausencia de cualquier efecto de gas residual. Esto identifica el problema con la concentración de gases en el pulmón en el momento de la adquisición de la imagen. Estos resultados indican la importancia que tiene el método de ventilación escogido y lo esencial que es el control de la composición de la mezcla de gas en la medida del ADC.

El estudio de medidas de ADC en animales, debería prestar una atención especial al gas residual, ya que algunas enfermedades se caracterizan por presentar diferentes capacidades tanto inspiratoria como residual (**13**). Así, para poder usar el ADC como un biomarcador fiable en la detección y evolución de enfermedades, tales como enfisema, es importante un completo control de la concentración de gases y del protocolo de ventilación.

Otros autores llevaron a cabo distintas estrategias con objeto de minimizar esta dependencia. Chen *et al.* **(14)** alternaron aire/isoflurano y gas hiperpolarizado, usando múltiples respiraciones para la adquisición de cada imagen, consiguiendo así una mezcla homogénea al cabo de varios ciclos de ventilación. Peces-Barba *et al.* **(15)** usaron un modelo animal post mortem, empleando una mezcla de gas, similar para todos los animales (a capacidad inspiratoria de 5 ml de ^3He en N_2). Dugas *et al.* **(12)** adquirió las imágenes a lo largo de múltiples respiraciones, adquiriendo una línea del espacio-k para cada corte y ciclo respiratorio.

Este método se aplicará en animales sanos y en animales tratados con elastasa con el objetivo de ver diferencias en ADC entre tejido sano y enfisematoso en medidas realizadas en una sola apnea. La eficacia de este método se mostrará en el próximo capítulo.

Chapter 7

**Application and validation of VOHeM method:
Comparison between healthy and whole- and
mono-lobular elastase-treated animals**

**Aplicación y validación del método VOHeM:
comparación entre animales sanos e instilados con
elastasa en pulmón completo y mono-lobular**

Chapter 7

7.1 Methodology

7.2 ADC differences between left and right lung in whole-lung induced animals

7.3 Application of VOHeM method to compare between healthy and emphysematous whole-lung induced animals at different ventilation conditions.

7.4 Application of VOHeM method in mono-lobular elastase-induced animals: measurements at different ventilation conditions.

7.5 Discussion

Introduction

In the previous chapter, the effect of different gas volumes and concentrations on ADC measurements was described and a ventilation method which minimizes this effect was proposed. Moreover, the method was tested in healthy animals to prove its efficacy comparing the results with the standard method.

As it was shown in **Chapter 6**, when ventilating with the standard method we could not distinguish between healthy and emphysematous lung tissue. In this chapter the new method (VOHeM) will be applied in healthy and emphysematous animals with the purpose of detecting differences in ADC. The measurements were performed at different ventilation conditions in order to find the condition which shows ADC differences between healthy and emphysematous lungs most clearly.

Furthermore, we will use a new procedure for instillation which consists of inducing elastase in only one lung of the rats while leaving the other lung as an internal control (healthy tissue). The animals induced this manner were ventilated and measured under the same conditions as the whole-induced elastase-treated animals. The objectives of this new instillation procedure, which has only been performed in dogs before, were both to reduce the number of subjects in the study and to reduce the inter-subject variability. Histological images of mono-lobular instilled animals were obtained to corroborate the method.

7.1 Methodology

Male Wistar rats were separated into three groups and imaged as explained in [Chapter 5](#) using VOHeM as a ventilation method. Group C consisted of ten control animals which were instilled with 0.4 ml saline. Sixteen rats were instilled with 20 units of elastase in dissolution of 0.4 ml of saline (group E). Finally, the group M consisted of mono-lobular elastase-instilled animals (n=18). In group M, emphysema was induced in the left lung (25 units of elastase in a 0.2 ml saline volume) leaving the right lung as an internal control. Animals induced in only one lung were divided in two subgroups, M4 (mono-lobular, four weeks after treatment, n=10) and MEP (mono-lobular, different expiration pressures, n=8).

Animal groups C and E were imaged in the same series of experiment 8 weeks after the treatment. The whole cohort of animals of group M was measured after 4 weeks and four animals of group M4 were also imaged 6 weeks after the elastase challenge.

Animals in group C, E and M4 were imaged at four different ventilation conditions (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH and PEEP5-EEV), where EI BH was ~ 23 mbar. Animals in group MEP were measured at different expiratory pressures, ranging from the end-inspiratory pressure (~ 23 mbar) to the end of the expiration (~ 0 mbar above atmospheric pressure). After reaching the end of the inspiration, animals were allowed to breathe out starting the expiration phase which was stopped at different pressure values (expiration pressure). The longer the expiration phase period the lower the expiration pressure.

A three-factorial analysis of variance with factors PEEP (0 mbar, 5 mbar), ventilation phase (EI BH, EEV) and treatment (control, elastase) as fixed effects was applied.

After imaging of the group M4 was completed, the pulmonary block was extracted and filled with 6% formalin solution at a pressure of 30 mbar during 24 hours. Lungs were cut in 5 different regions, three of them in the right lung (A, B and C, from up to down, respectively) and the other two in the left lung (D and E, from up to down, respectively) accordingly with anatomy ([Figure 7.1](#)). Each region was embedded with paraffin and sectioned into 5 μm slices which were stained with a standard protocol of hematoxylin-eosin (H&E).

Selected lung cuts were completely imaged with a digital slide scan (Zeiss Axiocam Mirax Panoramic MIDI) equipped with a digital camera (Hitachi HV-F22 3CCD). The region of

interest (ROI) for the histological study was manually chosen from each slice, avoiding mayor airways and vasculature in the field of view. The ROIs were defined by Mirax Viewer 1.11 (3DHistech) for a posterior analysis. The ROI size varied from 3 to 4 mm both height and width.

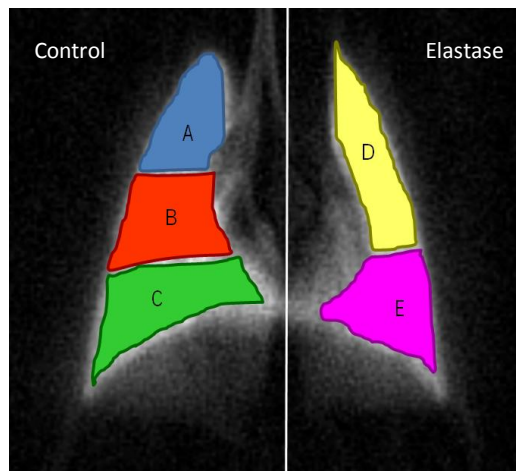


Figure 7.1

Sectioning regions of the lung for histological studies

Regiones en el que el pulmón se dividió para los estudios de histología

Linear intercept, alveolar internal area and equivalent radius were depicted in the histological images. To estimate the linear intercept in a particular ROI, a uniform grid consisted of horizontal, vertical and 45° oblique lines was superimposed on the image. Each time a line of the grid crosses the air-tissue interface, a single intercept was counted. The length of the line between intercepts was measured and distributed into intervals depending on its length. Each interval was represented by different color. The equivalent radius was extracted from the alveolar internal area. As well as for the linear intercept, the equivalent radius was distributed into 6 intervals represented by a different color. The color assigned to a certain length of the equivalent radius is the same as its corresponding alveolar internal area.

7.2 ADC differences between left and right lung in whole-lung induced animals

Two ROIs were defined in each diffusion-weighted image, covering only the most peripheral area of both left and right lungs (Figure 4.9). The ADC value was calculated from each ROI of all control and emphysematous animals at the four ventilation conditions (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH and PEEP5-EEV) as described in Chapter 4. ADC values of left and right lungs of group C and E are represented in Figure 7.2, showing a high correlation between both lungs in the two animal groups. The ADC values between left and right lungs were compared by using Student's t-test, at each ventilation condition in each animal group. No significant differences were found in any group at any of the ventilation conditions ($p > 0.05$).

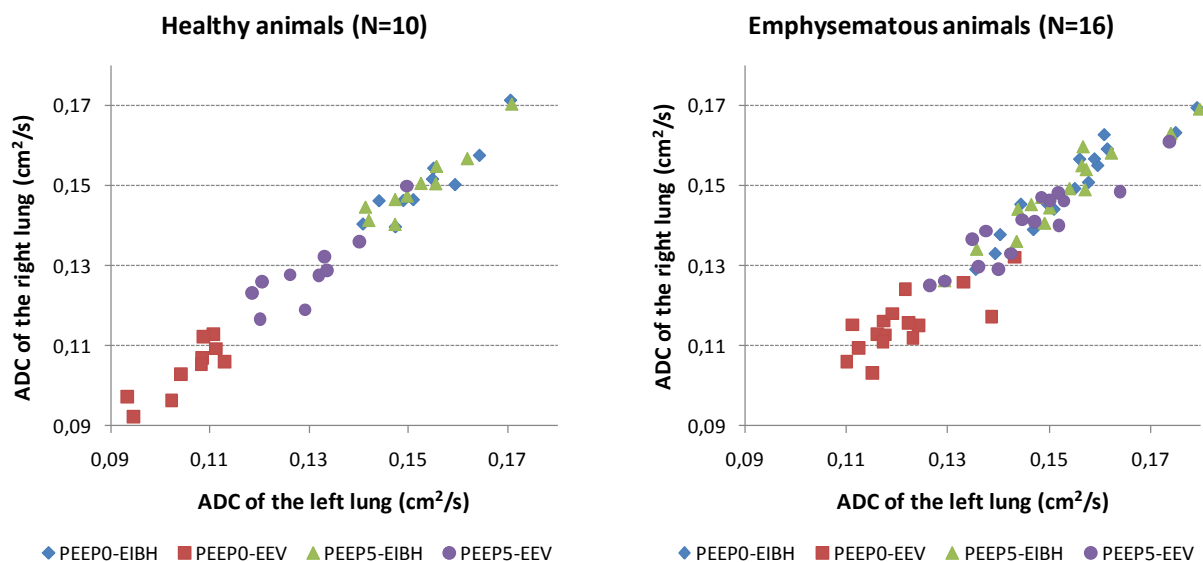


Figure 7.2

ADC comparison between left and right lung at four different ventilation conditions in healthy and whole-lung elastase-treated animals.

Comparación de los valores de ADC obtenidos del pulmón derecho e izquierdo a cuatro condiciones de ventilación diferentes tanto para animales sanos como para animales inducidos con elastasa a pulmón completo

7.3 Application of VOHeM method to compare between healthy and emphysematous whole-lung induced animals at different ventilation conditions.

For comparison among animals ADC value of left and right lung was averaged and considered as one value for each single animal. The mean and standard deviation of ADC for control and elastase-treated animals (group C and E) at EEV are represented in **Figure 7.3**. Elastase-treated animals showed higher ADC values than controls in each ventilation condition (PEEP0 and PEEP5). The pair-wise comparison between group C and E revealed a highly significant difference at PEEP0-EEV ($P < 0.0001$). This difference decreased at PEEP5-EEV ($P < 0.001$). Highly significant differences ($P < 0.0001$) were also found at EEV between PEEP0 and PEEP5 in both animal groups (C and E).

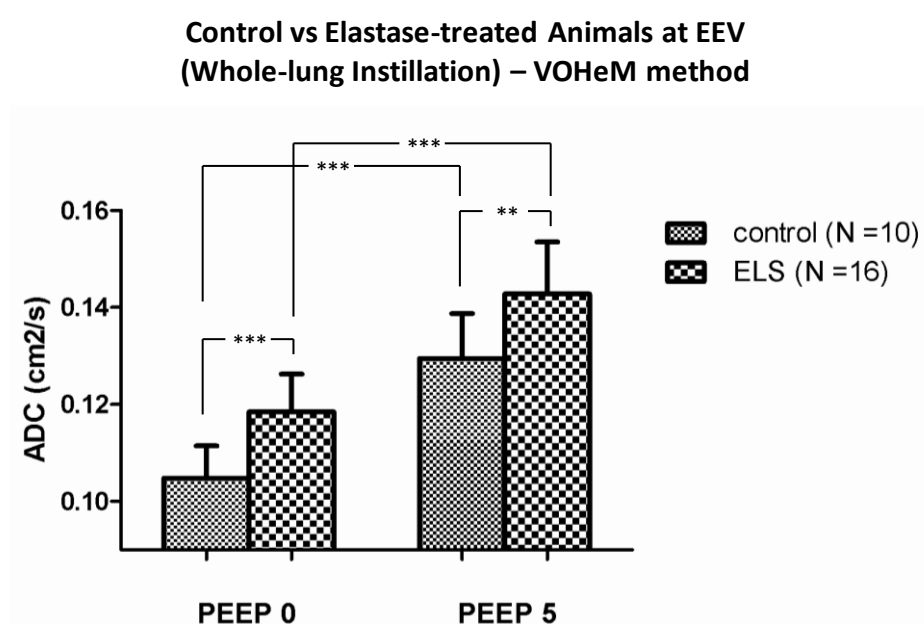


Figure 7.3

*Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous animals
(whole-lung instilled) at the end of the expiration (atmospheric pressure, EEV)*

*Media y desviación estándar del ADC en animales sanos y enfisematosos (inducidos en
pulmón completo) medidos al final de la espiración (EEV, presión atmosférica)*

Figure 7.4 shows the mean ADC values and their standard deviation for control and emphysematous animals (group C and E) imaged during a breath-hold of 23mbar of pressure (EI BH) at two different PEEP levels. Very similar ADC values were obtained in all measurements at EI BH, independent of the PEEP (PEEP0 or PEEP5) and of the treatment (control or elastase). Thus, the pair-wise comparison between control and elastase-treated

animals did not show significant differences at any PEEP when imaging at EI BH. ADC values obtained at EI BH were significantly greater than the respective one at EEV (paired Student's t-test). We note that the data plotted in **Figure 7.3** and **7.4** correspond to the same animal groups (C and E). The ADC values obtained in the control animals shown in **Figure 7.4** are in good agreement with the values shown in the previous chapter.

Control vs Elastase-treated Animals at EIBH (Whole-lung Instillation) – VOHeM method

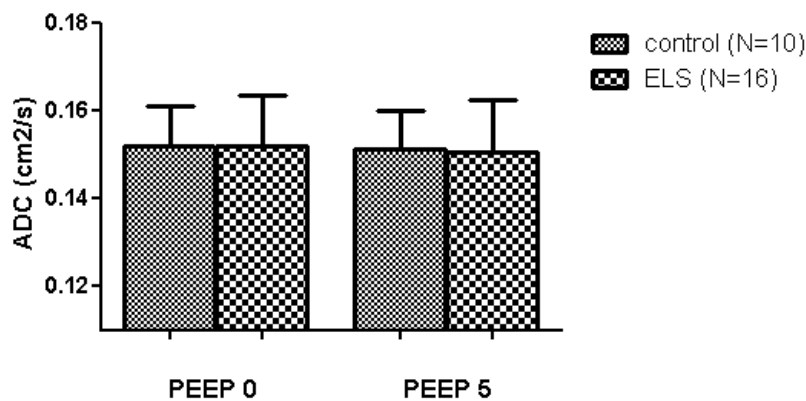


Figure 7.4

Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous animals (whole-lung instilled) at the end of the inspiration (~ 23 mbar above the atmospheric pressure, EI BH)

Media y desviación estándar del ADC en animales sanos y enfisematosos (inducidos en pulmón completo) medidos al final de la inspiración (EI BH, ~23 mbar sobre la presión atmosférica)

7.4 Application of VOHeM method in mono-lobular elastase-induced animals: measurements at different ventilation conditions.

ADC data obtained from group M4 (N = 10) at EEV and EI BH are shown in **Figure 7.5** and **7.6**, respectively. ADC values from right (healthy) and left (emphysematous) lungs were compared by performing the same pair-wise comparisons as for whole-lung induced animals. A great similarity between mono-lobular and whole-lung instillation was

encountered. This was revealed when looking at **Figure 7.3** and **7.5** on the one hand and **Figure 7.4** and **7.6** on the other hand. All ADC values obtained in M4 were higher than in groups C and E for every condition. We note that some of the differences between conditions in mono-lobular instillation show less level of significance than the same comparisons in whole-lung induced animals. That is the case when comparing between control and elastase lungs measured at PEEP5-EEV and also between PEEP0 and PEEP5 for the elastase-treated lung at EEV (**Figure 7.5**). As well as for whole-instilled animals, no differences were found at EI BH in any case in mono-lobular elastase-treated animals (M4) (**Figure 7.6**).

Four of the animals of M4 were also imaged 6 weeks after elastase challenge. The ventilation conditions were identical in both series of experiments. No significant differences in ADC were found between these two time points.

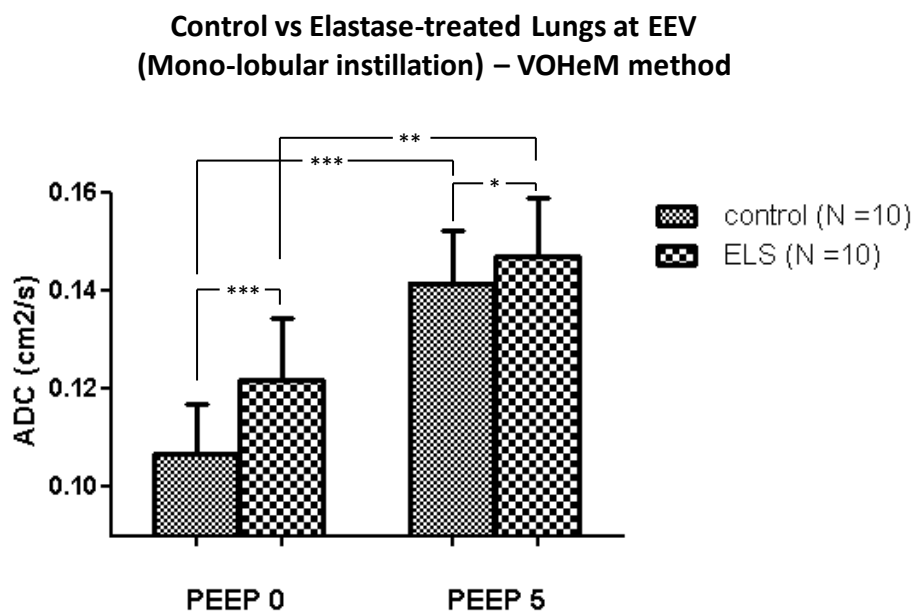


Figure 7.5

Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous lungs (mono-lobular instillation) at the end of the expiration (atmospheric pressure, EEV)

Media y desviación estándar del ADC en pulmones sanos y enfisematosos (inducción mono-lobular) medidos al final de la espiración (EEV, presión atmosférica)

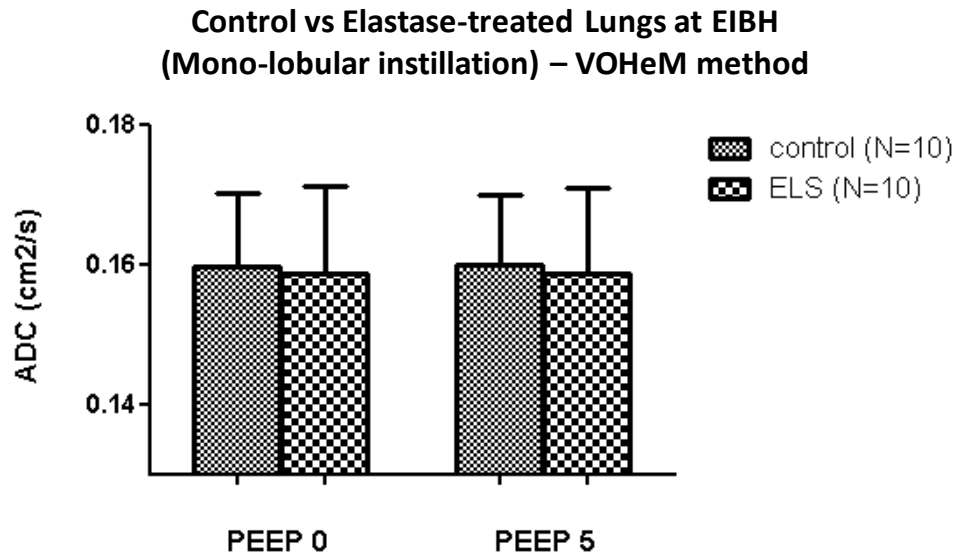


Figure 7.6

Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous lungs (mono-lobular instillation) at the end of the inspiration (~ 23 mbar above the atmospheric pressure, EI BH)

Media y desviación estándar del ADC en pulmones sanos y enfisematosos (inducción mono-lobular) medidos al final de la inspiración (EI BH, ~ 23 mbar sobre la presión atmosférica)

Animals of group MEP were used to obtain ADC values at different expiration pressures. The ADC-expiration pressure curve of a representative mono-lobular elastase-treated animal is shown in **Figure 7.7**. ADC values were extracted from right (control) and left (elastase-treated) lungs at each pressure. The range of the curve was from 0 mbar (EEV) to EI BH (~ 22 mbar). All the ADC values from the healthy lung were smaller than their respective ones from the emphysematous lung. At pressures higher than ~ 5 mbar, the ADC differences between both lungs were almost constant, thus the curves showed a parallel behavior. Moreover, the ADC values in this range remained roughly steady. However, from the cut-off pressure of 5 mbar to the EEV, the ADC values started to decline. The ADC obtained from

control lung decreased in a greater extent than the elastase-treated lung. Thus, the ADC differences at EEV were more notable than at higher pressures.

All animals of group MEP showed the same principal behavior as the one shown in Figure 7.7. However, the very curve varied from animal to animal. Not only ADC values of the curve fluctuated among animals but also the degree of drop at low pressures. This particular animal showed low ADC values at EEV and low EI BH pressure (21 mbar).

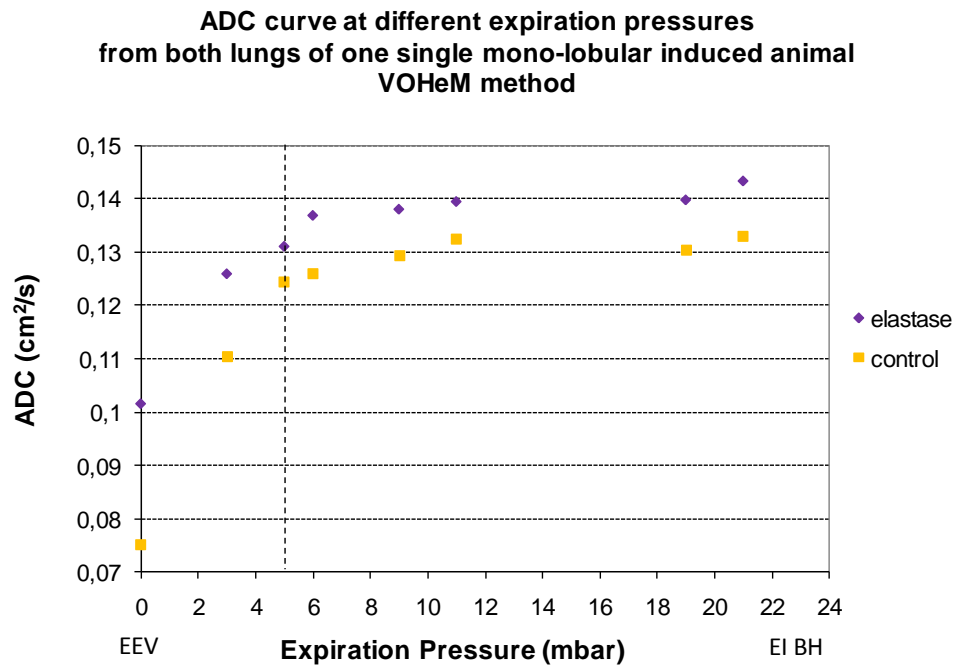


Figure 7.7

ADC values obtained from the healthy and emphysematous lungs at several expiration pressures ranging from EEV to EI BH of a representative mono-lobular elastase-instilled animal. The vertical dash line points the cut-off pressure. The maximum and minimum pressure values correspond to the end of the inspiration (EI BH) and the end of the expiration (EEV), respectively. For this particular animal EI BH pressure was 21 mbar.

Valores de ADC obtenidos del pulmón sano y del enfisematoso a varios valores de presión de espiración (desde EEV hasta EI BH) para un animal tratado con inducción mono-lobular. La línea vertical discontinua señala la presión de corte. Los valores máximo y mínimo de la presión corresponden con el final de la inspiración (EI BH) y el de la espiración (EEV), respectivamente. Para este animal en particular la presión a EI BH fue de 21 milibares.

Figure 7.8 is a representative ADC map of a mono-lobular instilled animal imaged at EEV. The left lung of the animal (elastase-treated) is represented in the right side of the image exhibiting higher ADC values than the control lung. The ADC maps allow the direct visualization of ADC differences between healthy and emphysematous tissue. The entrance of the bronchi in the lungs is marked by arrows. It is clearly seen that the bronchi show higher ADC values.

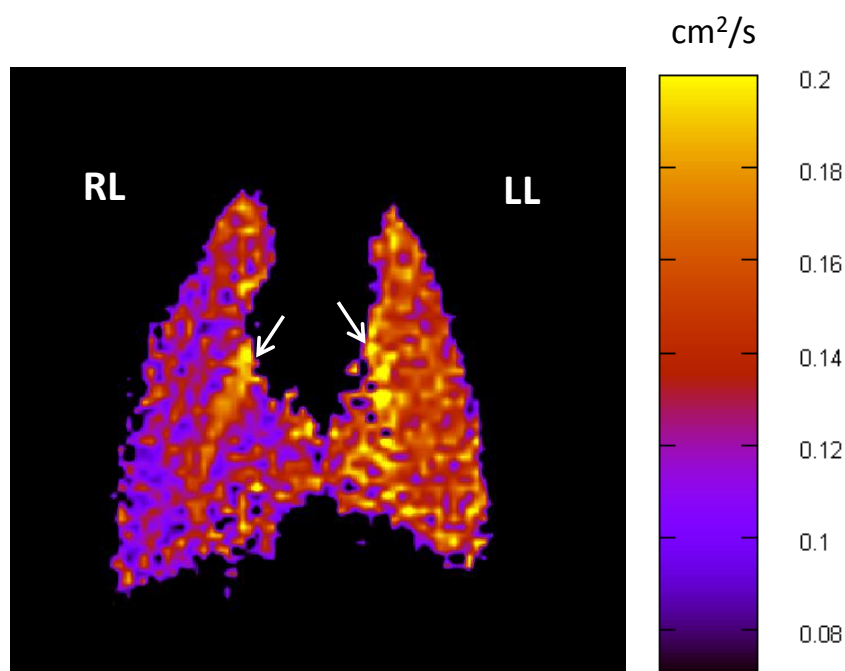


Figure 7.8

ADC map of a representative mono-lobular instilled animal. Arrows indicate the entrance of the bronchi in the lungs. The map corresponds to an animal imaged at EEV. Elastase-treated lung appears on the right hand side and shows higher ADC values

Mapa representativo de ADC de un animal tratado con inducción mono-lobular. Las flechas muestran la entrada de los bronquios en el pulmón. El mapa corresponde a un animal medido a EEV. En el lado derecho de la imagen aparece el pulmón tratado con elastasa, mostrando valores de ADC mayores

For histological studies, lungs were divided into five regions, three in the control lung (A-C) and the other two in the elastase-treated lung (D and E) as it was shown in **Figure 7.1**. **Figure 7.9** shows the histological images (H&E stain) from region A and region D of a representative

mono-lobular instilled animal. The homogeneous spatial distribution and the rounded shape of the airspaces of the healthy lung can be seen (A). The damage caused by the elastase treatment (destruction of alveolar walls and alveoli enlargement) is shown by the heterogeneity and the sharpness of the airspaces which characterizes emphysema (D). An enlargement of the airspaces in the emphysematous lung compared to the healthy one is also seen.

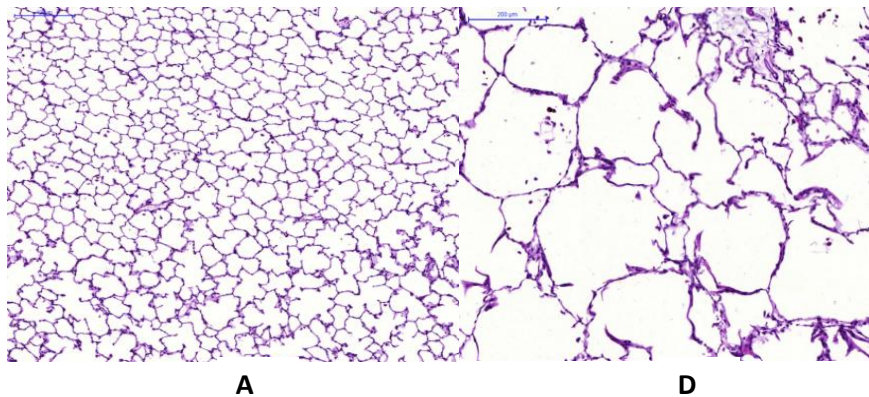


Figure 7.9

H&E (hematoxylin and eosin) stained images from region A and D of a representative mono-lobular instilled animal. The homogeneity of the airspaces in the healthy tissue contrasts to the heterogeneity and sharpness of the emphysematous lung. Scale bar is the same in both images and indicates 200 μ m

Imágenes histológicas (teñido H&E) obtenidas en la región A y D de un mismo animal tratado con elastasa en inducción mono-lobular. La homogeneidad de las estructuras alveolares en el tejido sano contrasta con la heterogeneidad del tejido enfisematoso. La barra muestra la misma escala en las dos imágenes (200 μ m)

Three different parameters were qualitatively examined from the histological images: linear intercept, area of the airspaces and equivalent radius. To estimate the linear intercept in a particular ROI, a uniform grid consisted of horizontal, vertical and 45° oblique lines was superimposed on the image. The length of line between intercepts is measured and distributed into six different groups identified by different colors in the images (**Figure 7.10** and **Figure 7.11**). The equivalent radius is obtained from the area, e.i. each airspace is

symbolized by a circle with the equivalent area and thus the radius of the circle can be calculated. The scale of the equivalent radius was divided into six to be represented by colors. Thus, each airspace was identified by a color, accordingly with the equivalent radius, and this color was also taken for the same airspace in the alveolar internal area image.

The images of a representative ROI in region A (healthy lung) of a mono-lobular instilled animal showing these three parameters can be seen in **Figure 7.10**. It is clearly seen that this ROI shows a high content of small airspaces and the images tends to a dark blue tonality. The opposite is seen in **Figure 7.11**, which shows the same histological metrics of a ROI in region D (elastase-treated lung) of the same mono-lobular instilled animal as in **Figure 7.10**. In these images a lower number of airspaces but with a larger area which is characteristic of emphysematous tissue is observed.

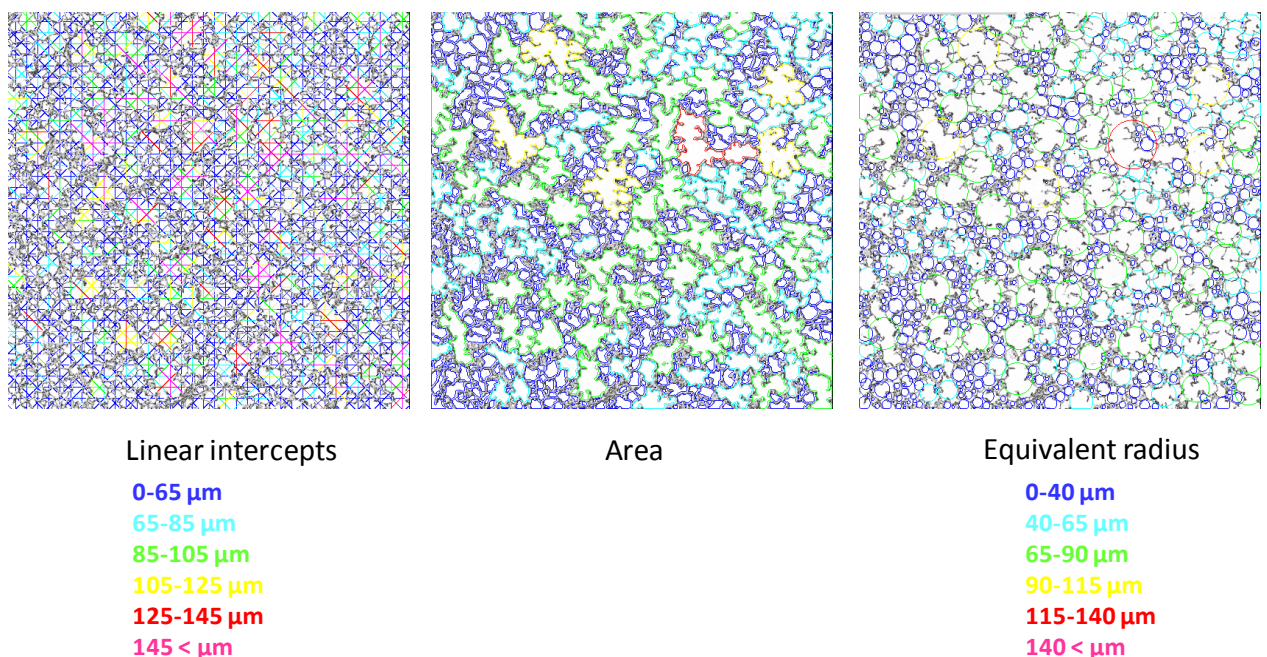


Figure 7.10

A histological image from region A (healthy lung) of a mono-lobular instilled animal showing the analysis of three different parameters: linear intercept, area of the airspaces and equivalent radius

Imagen histológica de la región A (pulmón sano) de un animal tratado con inducción mono-lobular. Se muestra el análisis de tres parámetros diferentes de histología: intersección lineal, área de los espacios alveolares y radio equivalente

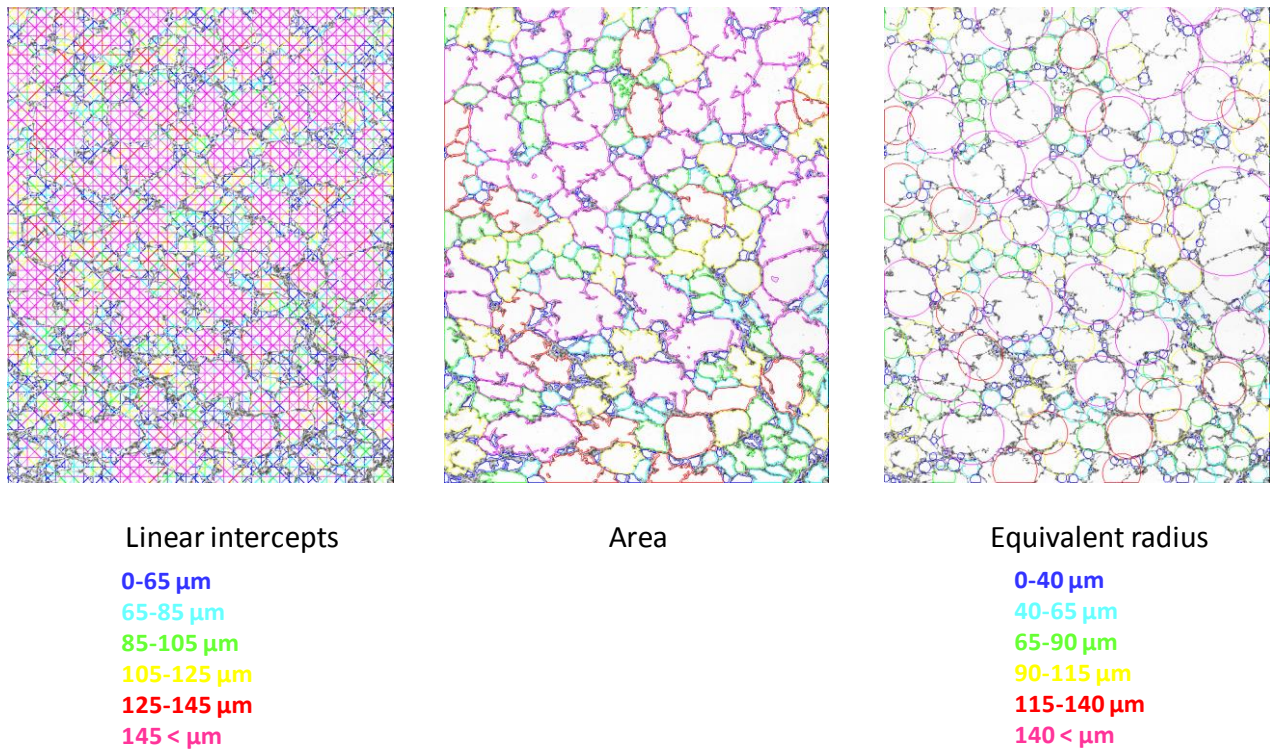


Figure 7.11

A histological image from region D (elastase-treated lung) of a mono-lobular instilled animal showing the analysis of three different parameters: linear intercept, area of the airspaces and equivalent radius

Imagen histológica de la región D (pulmón enfisematoso) de un animal tratado con inducción mono-lobular. Se muestra el análisis de tres parámetros diferentes de histología: intersección lineal, área de los espacios alveolares y radio equivalente

7.5 Discussion

As seen in the previous chapter, the residual and incoming gas volume had an effect on single breath-hold ADC measurements as long as these gases did not have similar diffusion coefficients. This is the case of ventilating with the standard method (air/pure HP^3He). The application of a PEEP was used as a maneuver to vary the residual gas volume (the higher the PEEP the higher the residual volume). **Figure 2.5** shows the different residual volume between healthy and emphysematous lungs. This difference in residual volume could have been the responsible for reducing the ADC differences between control and elastase-treated animals encountered when ventilating with the standard method during a single breath-hold

(Chapter 5.7). This small ADC differences did not permit to distinguish between healthy and emphysematous tissue.

In Chapter 6, we proved the efficiency of VOHeM method in minimizing ADC dependency on residual gas volume and in Chapter 7 we have applied this ventilation method in control and elastase-treated animals with the aim of finding ADC differences which were not found when ventilating with standard method. Moreover, we looked for the ventilation conditions at which the ADC differences between healthy and emphysematous lungs were more notable and easily recognizable. To reduce the number of subjects to be studied and the inter-subject variability, VOHeM method was also applied in mono-lobular elastase-treated animals.

All animals studied in this Chapter were ventilated with VOHeM method at four different ventilation conditions (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH and PEEP5-EEV).

Very different results were found when comparing the ADC data acquired at EEV and at EI BH in whole-lung induced animals. Significant differences between healthy and emphysematous lungs were clearly seen in measurements at EEV, i.e. PEEP0-EEV and PEEP5-EEV, whereas no differences were found at EI BH.

The instillation of elastase produces a destruction of the alveolar walls increasing the size of the airspaces as well as a decrease of the elastic recoil, thus differences in alveolar size and in lung compliance are directly related to lung emphysema (1, 2). Mercer *et al.* (3) suggested that the elastic and surface tension properties of the alveoli are predominant in the volume range around the functional residual capacity. Thus, we might expect to observe changes in alveolar level at EEV clearer than at EI BH which is in total agreement with the results.

ADC differences between healthy and emphysematous tissue have been reported when acquiring the data in continuous breathing mode (4, 5). Chen *et al* (4) reported very similar results to ours, that is, significant differences at EEV between control and elastase-treated animals and no differences at EI BH. In this ventilation mode, the HP-gas completely removes the residual air inside the lung after some ventilation cycles, homogenizing the gas mixture. The continuous acquisition over several breathing cycles has the limitation that the HP-gas must be mixed with oxygen. Moreover, the biggest disadvantage compared to single breath-hold experiments is the large amount of HP³He which is required.

Mono-lobular instillation permits to reduce the number of subjects to be studied by half while keeping the statistical power and to remove the inter-subject variability. The unilateral elastase induction had been performed in dogs (6-8). Yet, we have proved for the first time the feasibility of instilling elastase in only one rat lung which is a greater challenge due to the small size of these animals (~ 250g) compared to dogs (~ 20 kg). It was possible to perform this because no significant ADC differences between left and right lungs were found either in control animals or in elastase-treated animals. This indicated that the elastase instillation caused a similar degree of emphysema development in both lungs. The ADC measurements and the pair-wise comparisons between different ventilation conditions and treatments (control or elastase) showed the same principal behavior in mono-lobular treated animals (M4) as in whole-lung treated animals (C and E). We note that the ADC values obtained in M4 were higher than the respective ones in groups C and E. The level of significance in some of the pair-wise comparisons between ventilation conditions was lower in M4 than in groups C and E.

The histological images can be considered as a final proof of the success of mono-lobular rat lung instillation. These images showed the differences in lung microstructure between right and left lung of a mono-lobular elastase-treated animal. A very homogeneous and rounded structure was seen in the control lung whereas the emphysematous showed heterogeneity, sharpness and a clear expansion of the airspaces due to the destruction of a part of the tissue caused by the elastase. Mean linear intercept, alveolar internal area and equivalent radius gave qualitative information about differences in the microstructure between healthy and emphysematous tissue. Furthermore, the instillation of one lung allows us to visualize differences between healthy and emphysematous tissue for the very same animal by means of ADC maps.

References

1. West JB. Pulmonary Pathophysiology: the essentials. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
2. West JB. Respiratory Physiology: the essentials. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
3. Mercer RR, Laco JM, Crapo JD. Three-dimensional reconstruction of alveoli in the rat lung for pressure-volume relationships. *J Appl Physiol* 1987;62(4):1480-1487.
4. Chen XJ, Hedlund LW, Moller HE, Chawla MS, Maronpot RR, Johnson GA. Detection of emphysema in rat lungs by using magnetic resonance measurements of ^3He diffusion. *PNAS* 2000;97(21):11478-11481.
5. Dugas JP, Garbow JR, Kobayashi DK, Conradi MS. Hyperpolarized (^3He) MRI of mouse lung. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1310-1317.
6. Woods JC, Yablonskiy DA, Choong CK, Hogg JC, Cooper JD, Conradi MS. Measuring the progression of emphysema in a canine model with ^3He diffusion MRI. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2005;13.
7. Tanoli TS, Woods JC, Conradi MS, Bae KT, Gierada DS, Hogg JC, Cooper JD, Yablonskiy DA. In vivo lung morphometry with hyperpolarized ^3He diffusion MRI in canines with induced emphysema: disease progression and comparison with computed tomography. *J Appl Physiol* 2007;102(1):477-484.
8. Chino K, Choong CK, Toeniskoetter PD, Cooper JD, Lausberg HF, Bae KT, Pierce JA, Hogg JC. A CANINE MODEL FOR PRODUCTION OF SEVERE UNILATERAL PANACINAR EMPHYSEMA. *Experimental Lung Research* 2004;30(4):319-332.

Capítulo 7: Aplicación y validación del método VOHeM: comparación entre animales sanos e instilados con elastasa en pulmón completo y mono-lobular

7.1 Metodología

7.2 Diferencias de ADC entre pulmón izquierdo y derecho en animales inducidos en pulmón completo

7.3 Aplicación del método VOHeM para comparar animales sanos y enfisematosos inducidos en pulmón completo a diferentes condiciones de ventilación

7.4 Aplicación del método VOHeM en animales inducidos con elastasa en un solo lóbulo (mono-lobular): Medidas a diferentes condiciones de ventilación

7.5 Discusión

Introducción

En el capítulo anterior se describió el efecto que los volúmenes y concentraciones de gases ejercían sobre las medidas de ADC. Además, se propuso un método de ventilación, VOHeM, que minimizaba este efecto. VOHeM fue testado en animales sanos para probar su eficacia comparando los resultados con los obtenidos aplicando el método estándar.

Como ya se indicó en el **Capítulo 6**, al ventilar con el método estándar no se pudo diferenciar entre tejido pulmonar sano y enfisematoso. En este capítulo el método VOHeM se aplicará en ambos tipos de animales (sanos y enfisematosos) con el objetivo de detectar diferencias de ADC entre ellos. Las medidas se llevaron a cabo a diferentes condiciones de ventilación con el fin de encontrar la condición en la que sean más claras las diferencias en ADC entre pulmones sanos y enfisematosos.

Además aplicaremos un nuevo procedimiento de instilación, que consiste en inducir elastasa en ratas en solo un pulmón, dejando el otro pulmón como control interno. Los animales inducidos de esta manera también se ventilaron y se midieron bajo las mismas condiciones que las de los animales inducidos con elastasa en ambos pulmones. Los objetivos de este nuevo procedimiento de instilación, el cual solo se ha utilizado anteriormente en perros, fueron tanto reducir el número de sujetos en el estudio, como reducir la variabilidad inter-sujetos. Con el fin de corroborar este método, se obtuvieron las imágenes histológicas de animales instilados en un solo lóbulo.

7.1 Metodología

Los animales (ratas Wistar) se distribuyeron en tres grupos y se adquirió la imagen, tal y como se explicó en el **Capítulo 5**, usando el método de ventilación VOHeM. El grupo C lo constituía diez ratas control, que fueron instiladas con 0.4 ml de solución salina. Diez y seis ratas se instilaron con 20 unidades de elastasa en 0.4 ml de solución salina (grupo E). Finalmente el grupo M (mono-lobular) estaba constituido por animales instilados con elastasa en un solo pulmón ($n = 18$). En el grupo M, el enfisema se indujo en el pulmón izquierdo (25 unidades de elastasa en 0.2 ml de solución salina), dejando el pulmón derecho como control interno. Los animales inducidos en un solo pulmón se subdividieron en otros dos grupos, M4 (mono-lobular, cuatro semanas después de la instilación, $n = 10$) y MEP (mono-lobular, diferentes presiones de espiración, $n = 8$).

Las imágenes para los grupos C y E se adquirieron en la misma serie de experimentos, ocho semanas después del tratamiento. Todos los animales del grupo M se midieron a las cuatro semanas de haberlos inducido. Además, también se adquirieron imágenes de cuatro animales del grupo M4 seis semanas después de la inducción con elastasa.

Las imágenes para los animales de los grupos C, E y M4 se adquirieron a cuatro condiciones de ventilación diferentes (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH y PEEP5-EEV), siendo EI BH ~ 23 mbar. Los animales del grupo MEP se midieron a diferentes presiones de espiración, en el rango que cubre entre la presión al final de la inspiración (~ 23 mbar) y la presión al final de la espiración (~ 0 mbar por encima de la presión atmosférica). Inmediatamente después de alcanzar el final de la inspiración comienza la fase de espiración, la cual puede ser bloqueada en distintos momentos (distintas presiones de espiración). Cuanto más larga sea la fase de espiración menor será la presión de espiración.

Se aplicó un análisis factorial de varianza, con factores PEEP (0 mbares, 5 mbares), fase de ventilación (BH y EEV) y tratamiento (control y elastasa) como parámetros fijos.

Una vez adquiridas las imágenes de los animales del grupo M4, se extrajo el bloque pulmonar y se fijó en una solución de formalina al 6 % a una presión de 30 mbares durante 24 horas. Los pulmones se cortaron en cinco partes diferentes, tres en el pulmón derecho (A, B y C, de arriba a abajo, respectivamente) y las otras dos en el pulmón izquierdo (D y E, de arriba a abajo, respectivamente) de acuerdo con la anatomía pulmonar (**Figura 7.1**). Cada

región fue embebida en parafina y seccionada en láminas de 5 μm de espesor las cuales se tiñeron con un protocolo estándar de hematoxilina-eosina (H&E).

A los cortes de pulmón seleccionados se les adquirió la imagen con un escáner laminar digital (Zeiss Axiocam Mirax Panoramic MIDI) equipado con una cámara digital (Hitachi HV-F22 3CCD). La región de interés (ROI) para el estudio histológico se escogió manualmente en cada lámina, evitando las estructuras aéreas mayores y la vasculatura. Los ROIs fueron definidos con Mirax Viewer 1.11 (3DHistech) para ser posteriormente analizados. El tamaño de los ROIs varía entre 3 a 4 mm de alto y de ancho.

La media de la intersección lineal, el área interna de los espacios aéreos y el radio equivalente se muestran en las imágenes de histología. Para estimar la intersección lineal en un determinado ROI, se superpone sobre la imagen una malla constituida por líneas horizontales, verticales y oblicuas (45°). Cada vez que una línea de la malla cruza una interfase aire-tejido, se cuenta como una intersección. La longitud de la línea entre intersecciones se mide y se distribuye en intervalos dependiendo de su longitud. Cada intervalo está representado por un color diferente. El radio equivalente se extrae del área alveolar interna. Al igual que para la intersección lineal, el radio equivalente se distribuyó en seis intervalos representados por distintos colores. El color correspondiente al radio equivalente fue el asignado a su respectiva área alveolar.

7.2 Diferencias de ADC entre pulmón izquierdo y derecho en animales inducidos en pulmón completo

Se definieron dos ROIs en cada imagen de difusión, cubriendo solamente el área más periférica de ambos pulmones (**Figura 4.9**). El valor de ADC se calculó a partir de cada ROI de todos los animales tanto sanos como enfisematosos, bajo las cuatro condiciones de ventilación (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH and PEEP5-EEV), según fue explicado en el **Capítulo 4**. Los valores de ADC de los pulmones izquierdo y derecho de los grupos C y E están representados en la **Figura 7.2**, mostrando una alta correlación entre ambos pulmones en los dos grupos de animales. Se compararon, para cada condición de ventilación y cada grupo animal, los valores de ADC de los pulmones izquierdo y derecho usando la prueba t de

Student. No se encontraron diferencias significativas en ningún grupo ni en ninguna de las condiciones de ventilación ($p > 0.05$).

7.3 Aplicación del método VOHeM para comparar animales sanos y enfisematosos inducidos en pulmón completo a diferentes condiciones de ventilación

Para comparar los valores de ADC entre grupos de animales, se tomó la media de ADC entre el pulmón izquierdo y el pulmón derecho de cada animal. En la **Figura 7.3** se representa la media y desviación estándar de ADC para animales control y animales inducidos con elastasa (grupos C y E) a EEV y dos valores de PEEP diferentes. La media de los valores de ADC obtenidos en animales inducidos con elastasa en cada condición (PEEP0 and PEEP5) resultaron ser más altos que los respectivos valores obtenidos en animales control. La comparación por pares entre los grupos C y E revela una diferencia altamente significativa para PEEP0-EEV ($P < 0.0001$). Esta diferencia decrece para PEEP5-EEV ($P < 0.001$). Se encontraron elevadas diferencias estadísticas ($P < 0.0001$) a EEV entre PEEP0 y PEEP5 en ambos grupos de animales (C y E).

La **Figura 7.4** muestra los valores de la media de ADC y la desviación estándar de animales control y animales enfisematosos (grupos C y E) cuando se adquirió la imagen durante una apnea a 23 mbares de presión (EI BH) para los dos valores de PEEP. Valores muy similares de ADC se obtuvieron en todas las medidas a EI BH, independiente del PEEP (PEEP0 ó PEEP5) y del tratamiento (control ó elastasa). Así, la comparación por pares entre animales control e inducidos con elastasa no presentaron diferencias significativas a ningún PEEP cuando se adquiría la imagen a EI BH. Los valores de ADC a EI BH fueron significativamente más altos (prueba t de Student) que los respectivos obtenidos a EEV en todas las condiciones de ventilación. Los datos de la **Figura 7.4** corresponden a los mismos grupos de animales que en la **Figura 7.3** (C y E). Los valores de ADC obtenidos de los animales sanos mostrados en la **Figura 7.4** están en concordancia con los datos mostrados en el capítulo anterior.

7.4 Aplicación del método VOHeM en animales inducidos con elastasa en un solo lóbulo (mono-lobular): Medidas a diferentes condiciones de ventilación

Los datos de ADC obtenidos del grupo M4 (N=10) a EEV y a EI BH se muestran en las **Figuras 7.5 y 7.6**, respectivamente. Los valores de ADC del pulmón derecho (sano) e izquierdo (enfisematoso) se compararon usando las mismas comparaciones que para animales inducidos en pulmón completo. Se encontró una gran similitud entre los valores en tratamiento mono-lobular y tratamiento a pulmón completo. Esto quedó puesto de manifiesto observando las **Figuras 7.3 y 7.5** por un lado y las **Figuras 7.4 y 7.6** por otro. Sin embargo, todos los valores de ADC obtenidos en el grupo M4 resultaron ser mayores que en los grupos C y E para todas las condiciones de ventilación. Además, en el tratamiento mono-lobular las diferencias obtenidas en la comparación entre algunos de los grupos animales disminuyeron el nivel de significancia con respecto a sus respectivas en el tratamiento a pulmón completo. Este es el caso de la comparación entre pulmones de animales control y de animales inducidos con elastasa medidos a PEEP5-EEV, y también entre PEEP0 y PEEP5 para pulmones inducidos con elastasa a EEV (**Figura 7.5**). Al igual que en animales instilados en pulmón completo, no se encontraron diferencias a EI BH en el caso de animales inducidos con elastasa en un solo lóbulo (monolobular), grupo M4 (**Figura 7.6**).

Cuatro de los animales del grupo M4 fueron también medidos seis semanas después de la inducción con elastasa. Las condiciones de ventilación a las cuales se adquirieron las imágenes fueron las mismas que las aplicadas a las cuatro semanas. No se encontraron diferencias significativas en ADC entre las medidas después de 4 y de 6 semanas en ninguna de las condiciones de ventilación.

Los animales del grupo MEP se utilizaron para obtener valores de ADC a distintas presiones de espiración. La curva de ADC frente a las presiones de espiración para un típico animal con inducción mono-lobular se muestra en la **Figura 7.7**. Se obtuvieron dos valores diferentes de ADC para cada presión, uno del pulmón inducido con elastasa (pulmón izquierdo) y el otro, del pulmón control (pulmón derecho). El rango en el que se estudió el ADC fue desde 0 mbar (EEV) hasta ~ 22 mbar (EI BH). Los valores de ADC para el pulmón sano fueron menores que los respectivos para el pulmón inducido con elastasa a cada presión de espiración. A presiones mayores de ~ 5 milibares (presión de corte), la diferencia de ADC entre ambos pulmones fue prácticamente constante mostrando las curvas para cada pulmón un

comportamiento paralelo. Además, los valores de ADC fueron muy similares a todas las presiones en esta región de la figura. Sin embargo, desde esta presión de corte hasta la presión al final de la espiración (EEV), los valores de ADC decayeron al disminuir la presión. Los valores de ADC obtenidos para el pulmón sano sufrieron un descenso más acentuado que los valores del pulmón tratado con elastasa. Como resultado, las diferencias de ADC entre animales sanos y enfisematosos fueron más notables a EEV que a altas presiones.

Todos los animales del grupo MEP mostraron un comportamiento muy similar al animal mostrado en la **Figura 7.7**. Sin embargo, los valores de ADC y la caída a presiones bajas variaron ligeramente de animal a animal. Este animal en particular mostró valores bajos de ADC a EEV además de una baja presión a El BH (21 milibar).

La **Figura 7.8** representa un mapa de ADC de un animal sometido a instilación mono-lobular. El pulmón izquierdo del animal (inducido con elastasa) está representado en la parte derecha de la imagen mostrando valores más altos de ADC que el pulmón control. Los mapas de ADC permiten la visualización directa de las diferencias de ADC entre tejidos sanos y tejidos enfisematosos. La entrada de los bronquios en los pulmones está marcada por flechas. Se ve claramente que los bronquios presentan valores más altos de ADC.

Para los estudios histológicos, se dividieron los pulmones en cinco regiones, tres en el pulmón control (A-C) y otras dos en el pulmón inducido con elastasa (D y E), como se muestra en la **Figura 7.1**. La **Figura 7.9** representa las imágenes histológicas de la parte superior tanto del pulmón derecho (región A) como del pulmón izquierdo (región D) de un animal tratado con instilación mono-lobular. Se observa la distribución homogénea y forma más o menos redondeada de los espacios alveolares del pulmón sano (región A). El daño causado por la inducción de elastasa (destrucción de las paredes alveolares y agrandamiento de los alveolos) queda patente por la heterogeneidad y angulosidad del tejido, lo cual caracteriza al enfisema (región D). Así mismo se puede ver el aumento de los espacios alveolares en el pulmón con enfisema comparado con el pulmón sano.

Se examinaron cualitativamente tres parámetros histológicos diferentes: intersección lineal, área interna de los espacios alveolares y radio equivalente. Las imágenes de la **Figura 7.10** muestran estos tres parámetros para un ROI representativo de la región A (pulmón sano). Se observa la gran cantidad de espacios alveolares de pequeñas dimensiones presentando las

imágenes una tonalidad azul oscura. Lo contrario se observa en la **Figura 7.11**, que muestra las imágenes pertenecientes a la región enfisematosa (D) del mismo animal (inducción mono-lobular). Estas imágenes aparecen con tonalidad rojiza y contienen un menor número de espacios alveolares pero de un mayor tamaño, lo cual es característico del tejido enfisematoso.

7.5 Discusión

Como se vio en el capítulo anterior, el volumen del gas residual y del gas entrante producen un efecto sobre las medidas de ADC en experimentos a presión fija, siempre y cuando estos gases no tengan coeficientes de difusión similares. Este es el caso de ventilar con el método estándar (aire/ HP^3He puro). La aplicación de un PEEP se usó como maniobra para variar el volumen del gas residual (a mayor PEEP, mayor volumen de gas residual). La **Figura 2.5** muestra el diferente volumen residual entre pulmones sanos y pulmones enfisematosos. Esta diferencia en el volumen de gas residual puede haber sido la responsable de reducir las diferencias de ADC obtenidas entre animales control y animales inducidos con elastasa con el método estándar (**Capítulo 5.7**). Esta pequeña diferencia en el ADC no permitió distinguir entre animales sanos y enfisematosos.

En el **Capítulo 6**, se demostró la eficacia del método VOHeM para minimizar la dependencia del ADC con el volumen residual y en el **Capítulo 7** se ha aplicado este método de ventilación en animales control y en animales inducidos con elastasa con objeto de hallar diferencias en ADC que no fueron encontradas con el método de ventilación estándar. Además, buscamos las condiciones de ventilación a las que las diferencias de ADC entre pulmones sanos y pulmones enfisematosos fuesen más notables y fácilmente reconocibles. El método VOHeM también se aplicó a animales inducidos con elastasa en un solo lóbulo para reducir el número de sujetos a estudiar y eliminar la variación entre sujetos.

Todos los animales estudiados en éste capítulo se ventilaron con el método VOHeM a cuatro condiciones de ventilación diferentes (PEEP0-EIBH, PEEP0-EEV, PEEP5-EIBH and PEEP5-EEV).

Se encontraron resultados muy diferentes cuando se compararon los datos de ADC adquiridos a EEV y a EI BH en animales inducidos en pulmón completo. Se observaron

diferencias significativas entre pulmones sanos y enfisematosos en medidas a EEV, es decir a PEEP0-EEV and PEEP5-EEV, mientras no se encontraron diferencias a EI BH.

La instilación de elastasa produce una destrucción de las paredes alveolares aumentando el tamaño de los espacios aéreos, así como una disminución de la elasticidad, por lo que las diferencias en el tamaño alveolar o en la compliancia del pulmón se relacionan directamente con el enfisema pulmonar **(1, 2)**. Mercer *et al.* **(3)** sugirieron que las propiedades elásticas y de tensión superficial de los alveolos predominan en el volumen de la capacidad residual funcional. Así, cabría esperar que cambios en el nivel alveolar sean más claros a EEV que a EI, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos.

Algunos autores observaron diferencias en el ADC entre tejidos sanos y enfisematosos, adquiriendo las imágenes en respiración continua **(4, 5)**. Chen *et al* **(4)** encontraron resultados muy similares a los nuestros, es decir, diferencias significativas a EEV entre animales control y animales inducidos con elastasa y no encontraron diferencias a EI BH. La ventilación en modo continuo hace que el gas hiperpolarizado elimine completamente el aire residual, homogeneizando la mezcla de gas en el pulmón después de una serie de ciclos de ventilación. Sin embargo, al ventilar de modo continuo el gas hiperpolarizado debe ser mezclado con oxígeno. La mayor desventaja de este modo comparado con la medición durante una sola apnea es la gran cantidad de HP^3He que se requiere para la adquisición de las imágenes.

La instilación mono-lobular permite reducir a la mitad el número de sujetos sometidos a estudio, conservando el poder estadístico, además de eliminar la variación entre sujetos. La inducción unilateral de elastasa se ha llevado a cabo en perros **(6-8)**. Nosotros hemos probado por vez primera, la viabilidad de instilar elastasa en un solo pulmón de rata lo que implica un gran reto debido al pequeño tamaño de estos animales (~ 250g) comparado al de los perros (~ 20 kg). Este procedimiento pudo ser llevado a cabo ya que no se encontraron diferencias significativas de ADC entre pulmón izquierdo y pulmón derecho, ni en animales control ni en animales inducidos con elastasa. Esto indicaba que la instilación con elastasa causaba un grado similar de desarrollo del enfisema en ambos pulmones. Las medidas de ADC y la comparación por pares entre diferentes condiciones de ventilación y tratamientos (control ó inducción con elastasa) mostraron un comportamiento similar en animales con

inducción mono-lobular (M4) que en animales tratados en pulmón completo (C y E). Sin embargo, los valores de ADC obtenidos en M4 fueron mayores que los respectivos de los grupos C y E, siendo el nivel de significación en algunas de las comparaciones entre condiciones de ventilación menor en el grupo M4 que en los grupos C y E.

Las imágenes histológicas obtenidas se pueden considerar como prueba definitiva del éxito de la instilación en un solo pulmón de rata. Las imágenes muestran las diferencias en la microestructura pulmonar entre pulmón derecho e izquierdo de un animal tratado con inducción mono-lobular de elastasa. Se puede ver una estructura homogénea y redondeada en el pulmón control mientras que el pulmón enfisematoso presenta expansión de los espacios alveolares, debido a la destrucción de parte del tejido producido por la elastasa. La media lineal de intersección, el área interna alveolar y el radio equivalente dan una información cualitativa acerca de las diferencias en la microestructura entre tejidos sanos y tejidos enfisematosos. Además, la instilación mono-lobular nos permite visualizar diferencias entre tejidos sanos y tejidos enfisematosos para un mismo animal por medio de los mapas de ADC.

Chapter 8

In-vivo diffusion weighting imaging using fluorinated gases: SF₆ and C₂F₆

Imágenes de difusión en-vivo con gases fluorados: SF₆ y C₂F₆

Chapter 8

8.1 Methods for ^{19}F -MRI experiments

8.2 MRI experiments with SF_6

8.2.1 SF_6 phantom measurements

8.2.2 In-vivo MRI experiment using SF_6

8.3 MRI experiments with C_2F_6

8.3.1 C_2F_6 phantom measurements

8.3.2 In-vivo MRI experiment using C_2F_6

8.4 Discussion

Introduction

In this Chapter, the signal from fluorinated gases will be used to acquire spin density and diffusion weighted images. Two gases with different diffusion properties, SF_6 and C_2F_6 , will be used in phantom and in in-vivo experiments. Preliminary tests carried out in phantoms will yield the set of imaging parameters which provides a reasonable SNR and diffusion weighting in a practical acquisition time. The quality of the images in ^{19}F -MRI experiments were assessed in phantom and in animals by means of SNR. Finally, mono-lobular elastase-instillation will be applied in some animals and ADC values obtained from DW images of healthy and emphysematous tissue will be compared.

8.1 Methods for ^{19}F -MRI experiments

The experiments were carried out on a 4.7 T Bruker Biospec spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) with a bore diameter of 40 cm and at a frequency of 188 MHz for fluorine. A broad-band tuneable home-built coil (fluorine-proton) was used in a transmit-receive mode. The scanner has a maximum gradient strength of 195 mT/m in the three principal directions, x, y and z, with a 250 μs rise-time to full amplitude.

FIDs are collected using a ComSpiRa (Combined Spiral and Radial) sequence in its pure radial modality (1). The diffusion weighting was accomplished by applying non-gap bipolar diffusion sensitizing gradients (BDSG) with sinusoidal shape (Figure 3.5). The interleaved scheme was chosen in order to compensate artifacts from motion by averaging (Figure 3.7). No slice selection was applied in any image.

As well as in helium experiments, an exponential equation was used to extract the ADC on a pixel-by-pixel basis from the signal intensity attenuation caused by the application of the diffusion gradients (Eq. 3.10).

Imaging procedures on fluorinated gases were tested in a home-built phantom made from a capillary of 0.28 mm of inner diameter. The phantom was filled either with SF₆ or C₂F₆. The capillary was about 20 m long with a total gas volume of around 5 ml. It was longitudinally rolled around a support structure of 64 mm length (Figure 8.1). The longest direction of the phantom was aligned with z-axis of the magnet. The capillary was open in both sides to allow the fluorinated gas to flow through in order to fill it. Once the fluorinated gases pushed out all the air inside the capillary both sides were closed and sealed.

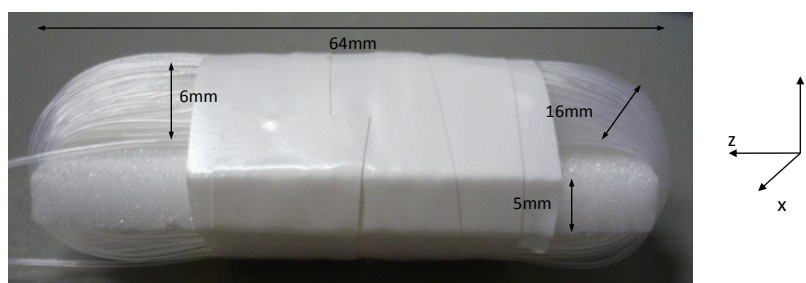


Figure 8.1

Dimensions of fluorinated gases capillary phantom and coordinate axis of the scanner. The longest direction of the phantom was aligned with the z-axis of the magnet.

Dimensiones del capilar usado como phantom en experimentos de gases fluorados. Eje de coordenadas del escáner. La dimensión mayor del phantom se alineó con el eje z del imán.

Particularly in fluorine imaging experiments, animals could not be anaesthetized with isoflurane since this contains ¹⁹F and could yield signal contribution. All animals measured in ¹⁹F-experiments were anaesthetized with 6% pentobarbital (0.1 ml/100 g animal weight).

Due to practical issues, animals were intubated with a cannula inserted in the trachea and connected to a standard veterinary respirator (Minerve, France). Tidal volume, ventilation frequency rate and inspiration/expiration ratio (I:E) were chosen according to the physiological values, i.e. 4 ml of tidal volume, 60 breaths per minute and 1:2, respectively.

A requirement for in vivo experiments was to provide animals with a breathing gas containing at least 21% O₂ to ensure good ventilation conditions. To accomplish the requirement, oxygen and the fluorinated gas were mixed before entering the ventilator. The necessary minimum total flow was 240 ml/min, as a result of 60 bpm (breaths per minute) with a tidal volume of 4 ml. In order to provide the necessary amount of oxygen, even in the case of a flow fluctuation, the final mixture contained a slightly higher concentration of oxygen.

8.2 MRI experiments with SF₆

8.2.1 SF₆ phantom measurements

The phantom filled with SF₆ was placed in the centre of the coil with the orientation shown in **Figure 8.1**.

The parameters for structural images were: FOV of 80 mm x 80 mm, reconstruction matrix size 128x128 and TR=10 ms. 200 radials with 128 points per phase were acquired and the number of averages was 64. Coronal, axial and sagittal images were obtained (**Figure 8.2 a, b and c**, respectively). The SNR of the three images was calculated. Coronal and sagittal orientations show a very similar SNR value around 8. However, the SNR increased considerably in axial projection (SNR=28) since the amount of gas which contributes to the signal in this orientation was higher than in the other two orientations.

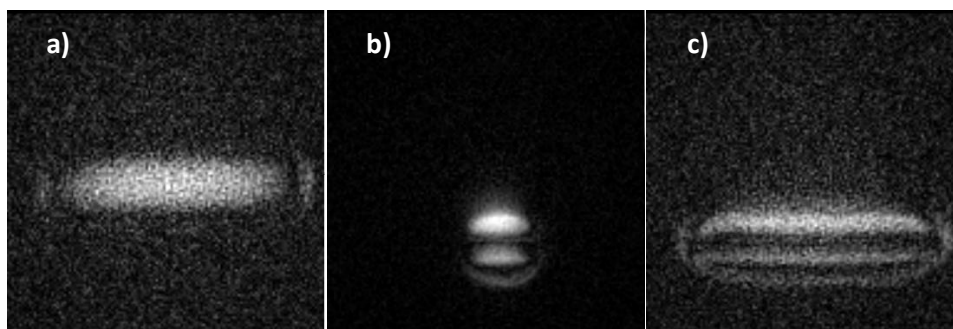


Figure 8.2

Anatomical images of SF₆ phantom in coronal (a), axial (b) and sagittal (c) orientation.

Imágenes anatómicas del phantom de SF₆ en orientación coronal (a), axial (b) y sagital (c).

The self-diffusion coefficient D_{aa} of SF₆ is 0.0328 cm²/s (2). In the case of a pure gas, the self-diffusion and the intra-diffusion coefficient have the same value, hence the intra-diffusion coefficient D_a^* of SF₆ is 0.0328 cm²/s. The free diffusion displacement follows the equation $L = \sqrt{(2D_a^*t)}$. For typical diffusion time values of 1, 1.5, 2 and 3 ms the calculated free diffusion displacement is 81, 99, 115 and 140 μm, respectively.

All diffusion weighted images were acquired in axial orientation. For diffusion experiment a TR of 8 ms was used. FOV, matrix size, number of radials, points per radial and number of averages were the same as for structural images (i.e. 80x80 mm², 128x128, 200, 128 and 64). The applied diffusion time was 1.5 ms. The 4 b-values chosen were 0.08, 3.8, 13.0 and 27.8 s/cm², the latter corresponds to 95% of gradient strength of the system. The diffusion gradients were applied in the three main orientations (X, Y and Z). The SNR in the image obtained using the highest b-value was very similar regardless of the orientation of the diffusion gradients. The ADC values and the fitting error obtained in the three different diffusion gradient directions are shown in Table 8.1. Similar ADC values were obtained when gradients were applied in the three main orientations, even if it seems that ADC along Z direction could be slightly higher. This is probably due to the fact that the capillary orientation was aligned with the Z axis but slightly oblique.

Diffusion gradient direction	X	Y	Z
ADC (cm ² /s)	0.024	0.0264	0.028
Fitting error	0.001	0.0008	0.001

Table 8.1

*ADC values and fitting error of the capillary phantom for X,
Y and Z orientation of the diffusion gradients.*

*Valores de ADC y error en el ajuste a la exponencial cuando los gradientes de difusión son
aplicados en X, Y y Z.*

Figure 8.3 shows the four diffusion weighted images acquired with a diffusion gradient applied in z direction and with a diffusion time of 1.5 ms. The SNR for the diffusion images decreases from 7 to 4 from lower to higher b-value images.

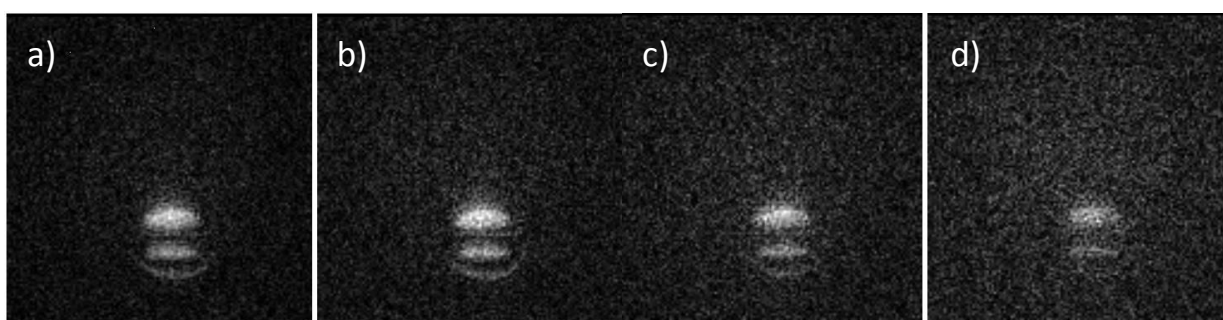


Figure 8.3

Set of four axial diffusion images acquired at 1.5 ms of diffusion time in Z direction for the SF₆ phantom (64 averages). The b-value increases from a) to d).

Imágenes de difusión en proyección axial adquiridas con un tiempo de difusión de 1.5 ms en dirección Z para el phantom de SF₆ (64 promediados). El valor de b usado en la imagen aumenta de a) a d).

8.2.2 In-vivo MRI experiment using SF₆

Healthy Wistar rats (~400 g) were used to obtain both spin density and diffusion weighted images with SF₆ using a radial ComSpiRa sequence. Animals were ventilated using a mixture of approximately 21% of O₂ and the 79% of SF₆, as explained in **Section 8.1**.

Figure 8.4 shows the anatomical image of a representative animal. The parameters used were: FOV of 80 mm x 80 mm, reconstruction matrix size 128x128, flip angle of ~ 20° and TR= 8 ms. K-space sampling was divided into 200 radial directions with 128 points per phase. 128 accumulations were acquired for each phase step. The resulted SNR for the anatomical image was 5. The total acquisition time for anatomical image was approximately 5 min.

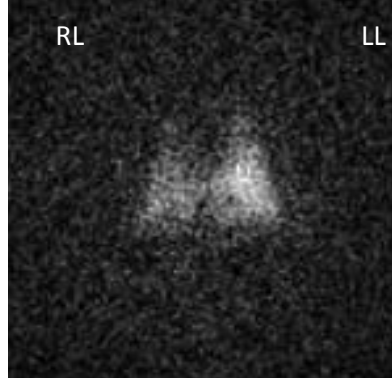


Figure 8.4

Anatomical image of a rat acquired with SF₆. RL and LL denote right and left lung, respectively.

Imagen anatómica de una rata adquirida con SF₆. RL y LL corresponde al pulmón derecho e izquierdo, respectivamente.

For the particular case of a binary mixture, **Eq. 3.2** can be simplified resulting in **Eq. 8.1**:

$$\frac{1}{D_a^*} = \frac{x_a}{D_{aa}} + \frac{x_b}{D_{ab}} \quad \text{Eq. 8.1}$$

The intra-diffusion coefficient D_a^* of a mixture of 79% SF₆ ($x_a=0.79$) and 21% O₂ ($x_b=0.21$) was calculated from **Eq. 8.1** where D_{aa} is 0.0328 and D_{ab} is 0.0902 cm²/s **(3)**. The resulted value for D_a^* was 0.0375 cm²/s. The free diffusion displacement is 86, 106, 122 and 150 μm for typical diffusion time values of 1, 1.5, 2 and 3 ms, respectively.

The four diffusion images (b-values ranging from 0.02 to 8.3 s/cm²) obtained with 1 ms of diffusion time are shown in **Figure 8.5**. The highest b-value was reached with 95% of the gradient strength. TR was 8 ms, matrix size was 64x64 and the number of averages was 1024. The total acquisition time was 35 minutes. 64 phase steps and 64 points per phase step.

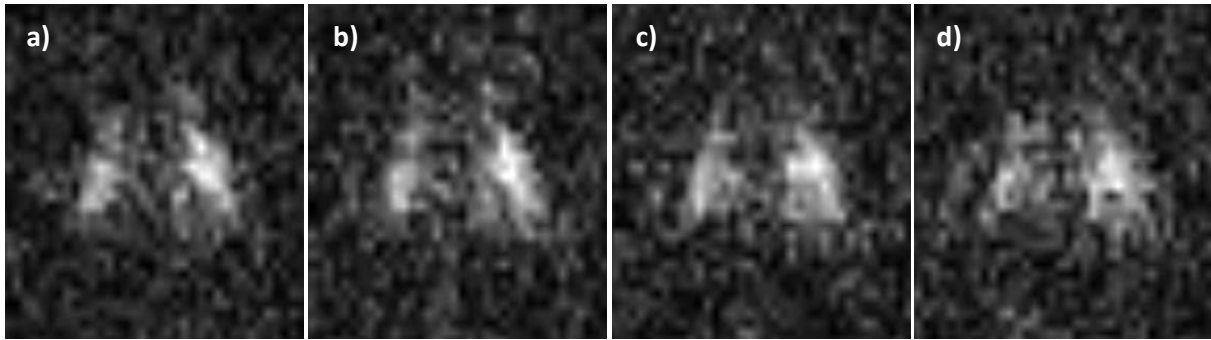


Figure 8.5

Set of diffusion images of a healthy rat acquired with SF_6 using a diffusion time of 1 ms. The b-value increases from the left image (b value= 0.02 s/cm^2) to the right (b value= 8.3 s/cm^2).

Imágenes de difusión para un animal sano adquiridas con SF_6 a un tiempo de difusión de 1 ms. El valor de b usado en las imágenes aumenta de la imagen de la izquierda (0.02 s/cm^2) a la de la derecha (8.3 s/cm^2).

A short T_1 limits the value of the diffusion time which can be used. Thus, T_d must be restricted to low values for gases with short T_1 , as SF_6 . In our case, the combination of short diffusion time and the gradient strength of the system yields low b-values. An exponential function is fitted to the signal intensity values obtained from the DW images. If the b-values are low (as it happens in our experiment) the signal loss is small, therefore they occupy the linear range of the fitting. The small decay in signal intensity between the lowest to the highest b-value images is prone to be considerably affected by the noise. This may lead to a higher error in the fitting, providing less accuracy in the ADC measurements. All this suggests that gases with longer T_1 and T_2 might be more appropriate to measure not only diffusion but also restriction in lung structures.

8.3 MRI experiments with C_2F_6

8.3.1 C_2F_6 phantom measurements

An initial test was performed with a glass bottle of 100 ml capacity ($\sim 40 \text{ mm}$ of external diameter) filled with pure C_2F_6 . The diffusion weighting parameters used to image this

phantom were: TR=8 ms, FOV of 80x80 mm², 64 averages, 128 radials and 64 points per radial. Images were acquired in axial projection and the gradients applied in Z direction.

Combinations of different diffusion times and gradient strength values used for an initial diffusion test are summarized in **Table 8.2**. The table also shows the maximum b-value and the obtained ADC values. It is indicated as “linear” when the decay in signal intensity over the diffusion weighted images was small and the values occupied the linear regime of the fitting:

	T_d (ms)	Max. diffusion gradient strength (%)	Max. b-value (s/cm²)	Linear Regime/ ADC (cm²/s) (fitting error)
I	1	90	5.8	Linear
II	2	80	46.8	0.0329 (0.0003)
III	3	20	10.0	Linear
IV	3	45	50.0	0.0338 (0.0003)
V	3	90	158.1*	0.0315

Table 8.2

Summary of the parameters used for testing a glass bottle containing ~ 100 ml of C₂F₆. () this b-value yielded a very noisy image.*

Resumen de los parámetros utilizados en pruebas con un frasco de ~ 100 ml de C₂F₆. La imagen obtenida con el valor de b marcado con asterisco estaba muy afectada por ruido.

The free intra-diffusion coefficient of C₂F₆ was measured by Jacob *et al.* (4) and resulted to be 0.033 cm²/s. Thus, the ADC values obtained from our experiment are in total agreement with this value.

The same phantom (glass bottle) was filled with a mixture of C₂F₆ and oxygen, in the same concentration as it was used to ventilate the animals. The diffusion time used in this case was 2 ms, the highest b-value was 46.8 s/cm² and the gradients were applied in the three main orientations (X, Y and Z). The values of the imaging parameters were TR= 20 ms, 16 averages, 80% of the gradient intensity, 128 radial and 64 points, matrix size 64x64. The ADC values (and the fitting error) obtained from the DW images in the three main diffusion gradient orientations are shown in **Table 8.3**:

Diffusion gradient direction	X	Y	Z
ADC (cm ² /s)	0.0430	0.0427	0.0418
Fitting error	0.001	0.0007	0.009

Table 8.3

ADC values and fitting error of the glass bottle phantom containing approximately 21% O₂ and 79% C₂F₆ for X, Y and Z orientation of the diffusion gradients.

Valores de ADC y error en el ajuste a la exponencial de un frasco con aproximadamente 21% O₂ y 79% C₂F₆ cuando los gradientes de difusión fueron aplicados en las direcciones X, Y y Z.

Jacob *et al.* (4) also measured the intra-diffusion coefficient ($D_a^* = 0.050$ cm²/s) of a mixture containing 50% O₂ and 50% C₂F₆. The inter-diffusion coefficient can be calculated using Eq. 8.1. With the resulted inter-diffusion coefficient value (0.103 cm²/s) the intra-diffusion coefficient of any other desired mixture of C₂F₆ and O₂ can be calculated as well. For the mixture used for in-vivo measurements (21% of oxygen) the calculated D_a^* was 0.0385 cm²/s. This value is slightly lower than the measured ADC values obtained in any of the three directions of the gradients. This could be explained if the mixture used to ventilate animals contains a higher amount of oxygen. In the particular case of a mixture containing 30% of O₂, D_a^* would be 0.0415 cm²/s which is in good agreement with the values shown in Table 8.3. This table also shows similar ADC values in the three gradient's orientations and similar to the free diffusion coefficient, indicating no restriction of the gas in the bottle, as expected due to the bottle size.

The capillary phantom used for SF₆ experiment was also used with C₂F₆ (pure). The phantom was placed as shown in Figure 8.1 and the images were acquired in axial projection at different diffusion times. The most important parameters were TR=20 ms, matrix size of 64x64, 64 averages and a total acquisition time of 5 minutes.

The ADC values obtained at different diffusion times in X, Y and Z orientation of the diffusion gradients are summarized in Table 8.4. As expected, a restriction in ADC values is observed when increasing the diffusion time in X and Y directions in a similar degree. However, the ADC values measured in Z direction (longitudinal axis) remained very similar independent of the diffusion time and similar to free diffusion coefficient for pure C₂F₆.

T_d (ms)	Highest b-value (s/cm ²)	X (ADC (cm ² /s) (fitting error))	Y (ADC (cm ² /s) (fitting error))	Z (ADC (cm ² /s) (fitting error))
1.0	5.8	0.0311 (0.0009)	0.0303 (0.0007)	0.0292 (0.0008)
1.5	25.0	0.0248 (0.0007)	0.0228 (0.0002)	-
2.0	50.0	0.02020 (0.00009)	0.0187 (0.0002)	0.02842 (0.00005)
3.0	50.0	0.0150 (0.0001)	0.0157 (0.0001)	0.0281 (0.0007)
3.5	50.0	0.0145 (0.0002)	0.0143 (0.0006)	0.0282 (0.0006)
4.0	50.0	0.0135 (0.0004)	0.0121 (0.0005)	0.026 (0.001)

Table 8.4

ADC values (fitting error) obtained from pure C_2F_6 capillary phantom at different diffusion times in the three main diffusion gradient orientations (X, Y and Z). The highest b-value corresponding to each diffusion time is also shown.

Valores de ADC (error en el ajuste) obtenidos del capilar llenado con C_2F_6 puro a diferentes tiempos de difusión para gradientes de difusión aplicados en las tres orientaciones principales (X, Y y Z). Se muestra también el mayor valor de b correspondiente a cada tiempo de difusión.

T_d (ms)	$L = \sqrt{2D_a^* T_d}$ (μ m)	L/capillary radius
1.0	81.2	0.58
1.5	99.5	0.71
2.0	114.9	0.82
3.0	140.7	1.005
3.5	152.0	1.09
4.0	162.5	1.16

Table 8.5

Characteristic free displacement of pure C_2F_6 at different T_d ($D_a^* = 0.033$ cm²/s). The last column of the table shows the ratio between the free diffusion displacement and the radius of the capillary phantom (140 μ m) where the gas is confined.

Desplazamiento libre característico para C_2F_6 puro a distintos tiempos de difusión ($D_a^* = 0.033$ cm²/s). La última columna de la tabla muestra la razón entre el desplazamiento libre y el radio del capilar (140 μ m) donde el gas está confinado.

The calculated characteristic diffusion length (or characteristic free displacement) of C_2F_6 at the studied diffusion times are shown in **Table 8.5**.

8.3.2 In-vivo MRI experiment using C₂F₆

In total 11 male Wistar rats were measured under the approval of the institutional animal care committee. Five of them were used as control animals whereas the other six were mono-lobular elastase-induced as explained in [Chapter 4.2](#). All animals were imaged 8 weeks after elastase challenge. The average animal weight at this time point was ~ 430 g.

Animals were i.p. anaesthetized with pentobarbital at a dose of 0.06 mg/kg animal weight. After intubation animals were placed in supine position on an NMR-compatible animal bed and connected to a ventilator (Minerve, France) which applied a tidal volume of 4 ml at a breathing frequency of 60 breaths per minute. A gas mixture consisting of approximately 25% oxygen and 75 % C₂F₆ (Linde Gas, Germany) was provided by the ventilator to the animals at an inspiration: expiration time ratio of 1:2.

All images were acquired in coronal orientation without slice selection. For anatomical images 128 points per phase and 200 phase steps were acquired. The reconstruction matrix size was 128x128 and the FOV 80x80 mm². A total of 512 averages were acquired which required a time of 17 minutes with a TR of 10 ms.

The parameters for diffusion weighting (DW) imaging were: 64 radial trajectories (phase steps), 128 points per phase, TR = 10 ms, 1024 averages, T_d = 1.5 ms applied in slice direction, flip angle of ~ 20°. Matrix size 64x64 with a field of view (FOV) of 80 x 80 mm², resulting in an in-plane resolution of 1.25 x 1.25 mm². The utilized b-values were 0.08, 3.4, 11.7 and 25 s/cm². The time required to acquire the four DW images was 44 minutes. No gating or triggering was used.

ADC values were obtained from different regions of interest (ROIs) which cover either the right (RL) or left (LL) lung for both control and elastase-treated animals. ROIs were defined manually thus no threshold was applied. Pair-wise comparisons were performed using a paired t-test to compare RL and LL of the same animal group (both control and mono-lobular elastase-treated). An unpaired t-test was used to compare the control lung of mono-lobular elastase-treated animals to the lungs (RL and LL) of control animals.

SNR value of each ROI was obtained by calculating the ratio between its signal intensity and the signal intensity in the background (noise) and multiplying it by $\sqrt{(\pi/2)}$, as mentioned in

Chapter 4.5. The SNR analysis was done for each b-value image. SNR values were averaged over all animals for each b-value and each lung (right or left). A paired Student's t-test was performed to look for differences between RL and LL.

A representative spin density image of a control animal acquired with C_2F_6 is shown in **Figure 8.6**. The right lung (RL) on the left side of the image shows higher signal intensity compared to LL.

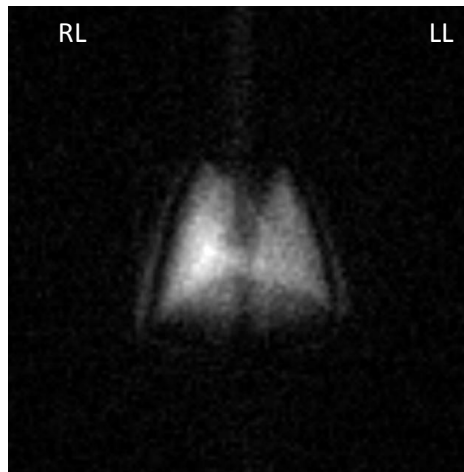


Figure 8.6

Spin density image of a representative control animal acquired with C_2F_6

Imagen anatómica para un animal control adquirida con C_2F_6

Figure 8.7 shows the four diffusion weighted images of a representative control animal. The trachea is not visible or poorly demarcated because the signal coming from this area in projection images is very weak. As expected, the image obtained with the highest diffusion weighting appears noisier than the rest of the images. Anatomical and DW-images shown in **Figures 8.6** and **8.7** correspond to the same animal. As well as in the anatomical image in the four DW-images RL appears brighter than LL. This was not only observed in this animal but in all control animals (n=5). For each b-value image the right lung showed statistically higher SNR than LL (p-values are shown in **Figure 8.7**).

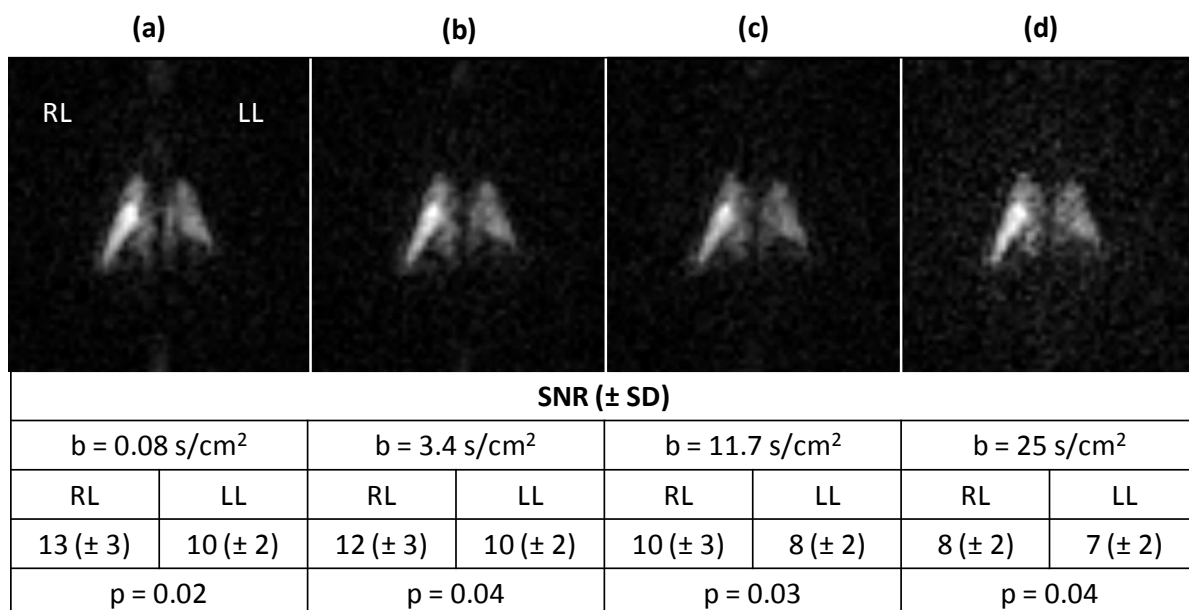


Figure 8.7

Diffusion weighted images acquired with C_2F_6 of a representative control animal. Mean SNR and the SD of all control animals obtained from each b -value and each lung (RL or LL). Pair-wise comparison between RL and LL performed by Student's t -test p -value).

Imágenes de difusión adquiridas con C_2F_6 para un animal control típico. Se muestra la media de SNR y SD obtenidos del pulmón derecho e izquierdo para el grupo de animales control a cada valor de b . Comparación entre pulmón derecho e izquierdo realizado con la prueba t de Student (valor p).

An anatomical image of a mono-lobular elastase-treated animal is shown in **Figure 8.8**. In contrast to controls, the LL of the elastase-treated animals (elastase induced) exhibits a higher signal intensity than the RL (control lung).

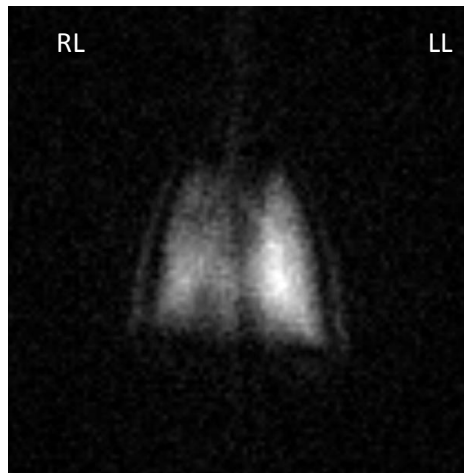


Figure 8.8

Anatomical image of a representative elastase-treated animal. Elastase was instilled in the left lung which shows higher signal intensity. Image acquired with C_2F_6 .

Típica imagen anatómica para un animal tratado con instilación mono-lobular. La elastasa fue inducida sólo en el pulmón izquierdo, el cual muestra una intensidad de señal mayor.

Imagen adquirida con C_2F_6 .

Analysis of the six mono-lobular elastase-treated animals was performed in the same manner as for the controls. The diffusion weighted images obtained with the four b-values from a representative elastase-treated animal are shown in **Figure 8.9**. In all diffusion images and for all animals the elastase-treated lung (LL) shows higher signal intensity than the control lung (RL). Significant differences in SNR between RL and LL when performing a paired Student's t-test in all DW images were found (p-values are shown in **Figure 8.9**).

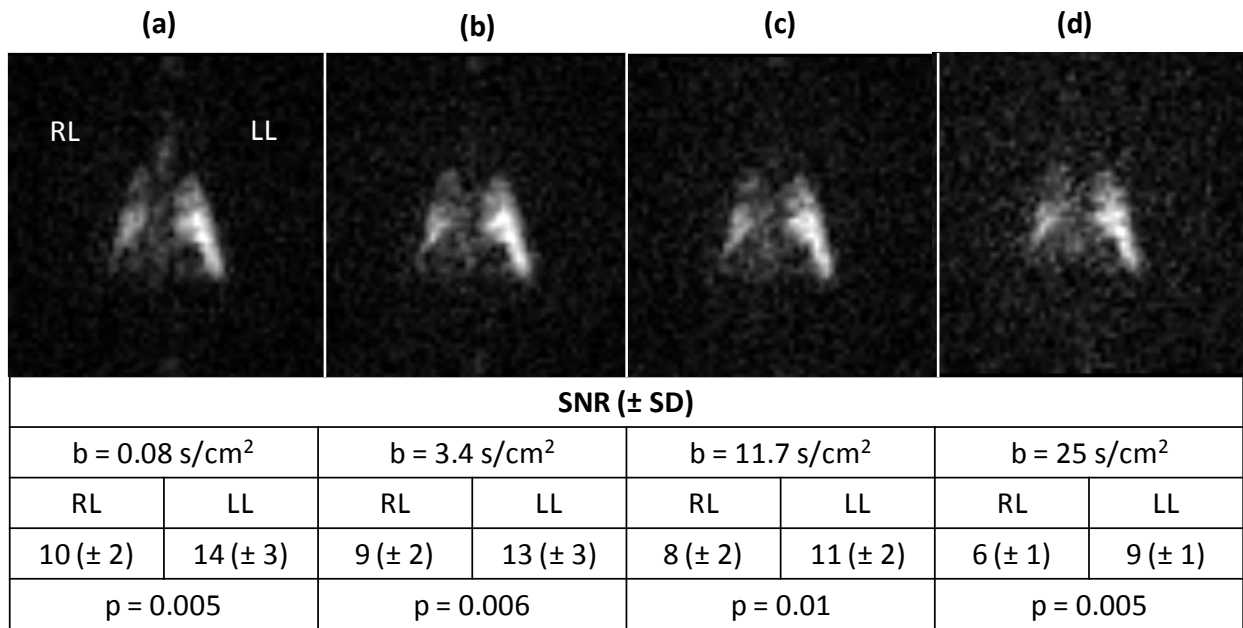


Figure 8.9

Diffusion weighted images acquired with C_2F_6 of a representative animal induced with elastase in the left lung. Mean SNR and the SD of all elastase-treated animals obtained from each b-value and each lung (RL or LL). Pair-wise comparison between RL and LL performed by Student's t-test (p-value).

Imágenes de difusión con C_2F_6 para un animal típico tratado con instilación mono-lobular. Se muestra la media de SNR y SD obtenidos del pulmón derecho e izquierdo para el grupo de animales tratados con elastasa para cada valor de b. Comparación entre pulmón derecho e izquierdo realizado con la prueba t de Student (valor p).

The ADC map corresponding to the diffusion weighted images of the control animal shown in **Figure 8.7** is presented in **Figure 8.10 (a)**. **Figure 8.10 (b)** shows the ADC map of the elastase-treated animal corresponding to DW-images in **Figure 8.9**. Note that both ADC maps use the same color scale. For the control animal, a similar color in both lungs is visible as well as the homogeneity over each lung. The contour of the lung has a remarkable change in color intensity (decrease in ADC value). This effect may be due to an underestimation of ADC in the border structures in projection images. The color intensity shown by the control lung (RL) of the elastase-treated animal is similar to the one obtained from both lungs of the

control animal, whereas LL had brighter color intensity which corresponds to higher ADC values.

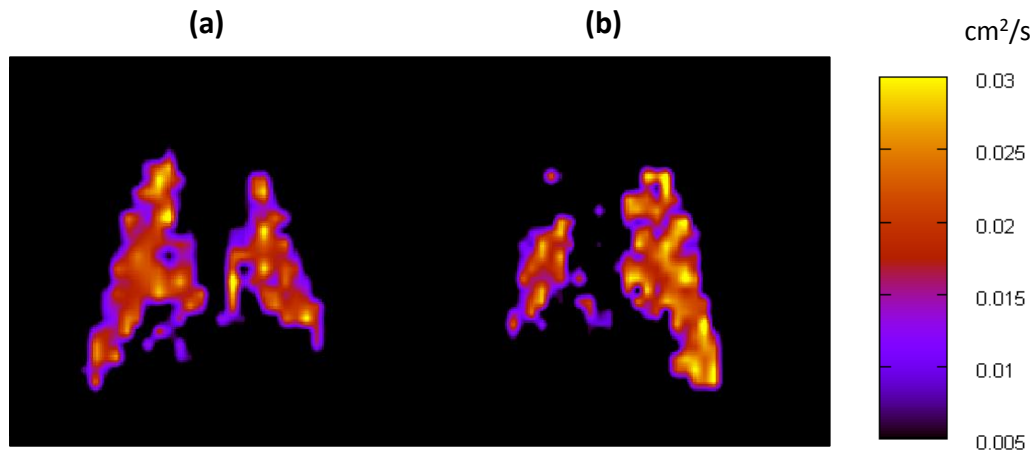


Figure 8.10

*ADC maps of representative control (a) and mono-lobular elastase-treated (b) animals. The ADC maps were obtained from the set of diffusion weighted images shown in **Figures 8.7** and **8.9**, respectively.*

*Mapas de ADC de un animal control (a) y de uno tratado con elastasa en un solo pulmón (b). Estos mapas de ADC fueron obtenidos de las imágenes de difusión mostradas en las **Figuras 8.7 y 8.9**, respectivamente.*

The individual ADC values obtained from RL and LL of all control and elastase-treated animals are plotted in **Figure 8.11**. The horizontal line represents the mean ADC from all lungs for each ROI. No differences were found between left ($\text{ADC} = 0.0193 \pm 0.0005 \text{ cm}^2/\text{s}$) and right ($\text{ADC} = 0.021 \pm 0.002 \text{ cm}^2/\text{s}$) lungs of control animals when performing a paired t-test. The ADC values of the control lung (RL) of the mono-lobular elastase-treated animals were compared to both lungs of the control animals using an unpaired t-test. In both cases no statistical differences were found either. The ADC value ($\text{ADC} = 0.023 \pm 0.004 \text{ cm}^2/\text{s}$) obtained from the emphysematous lung (LL of elastase-treated animals) was higher ($p = 0.03$) compared to RL ($\text{ADC} = 0.019 \pm 0.002 \text{ cm}^2/\text{s}$) of the same animals (paired t-test). It is seen that the variation of those values was greater than for the other three lungs which might be due to differences in the development of the emphysema in each animal.

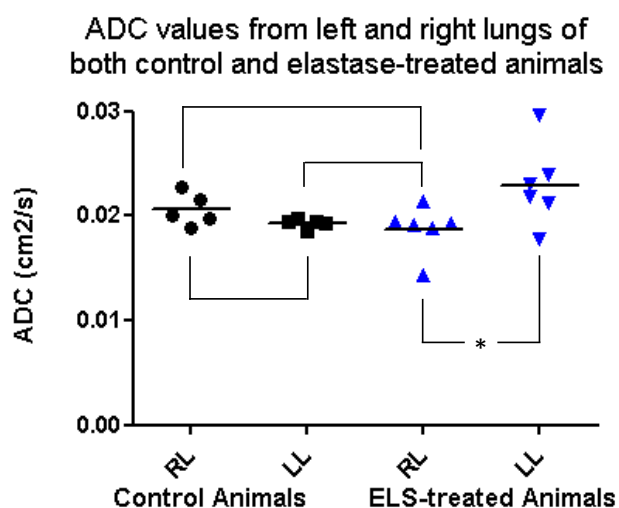


Figure 8.11

Individual ADC values obtained from both lungs (RL and LL) of control and mono-lobular elastase-treated animals. Statistical differences were found when comparing elastase-treated lung with its control lung. Pair-wise comparison between control lungs did not show significant differences.

Valores individuales de ADC obtenidos del pulmón derecho e izquierdo (RL y LL) tanto de los animales control como de los tratados con elastasa en inducción mono-lobular. Se observaron diferencias significativas entre el pulmón tratado con elastasa y su respectivo control. No se encontraron diferencias significativas entre pulmones control.

8.4 Discussion

A great concern with fluorinated gases in MRI (especially in the case of pre-clinical studies) is to reach sufficient signal intensity to have an adequate SNR. Generally, different strategies are used to increase the SNR and some are listed by Jacob and co-workers (4). They mention among others the magnetic field of the scanner, the coil and the signal averaging, the latter one as a simple and very common approach. A high number of signal averages without considerably prolonging the total acquisition time can be performed thanks to the relatively short T_1 and T_2 values of these gases. In this respect, gases such as SF_6 which possesses shorter relaxation times (in the order of 2 ms) than C_2F_6 (~ 10 ms) would be advantageous,

allowing for the reduction of T_R and acquiring more averages in the same period of time. However, the short relaxation times of these gases restrict the diffusion time to low values. Thus, usage of very short T_1 and T_2 gases leads to two main drawbacks in diffusion weighting MRI. Firstly, these short diffusion times must be combined with large gradient strengths in order to achieve appropriate b-values. In the case of using too high or too low b-values the ADC measurements will be more prone to be affected by the noise level. This will lead to less accuracy in the obtained ADC values. Secondly, the chosen diffusion time must be large enough to detect restriction in the structure. When the diffusion time is limited to low values the diffusion might be in the free diffusion regime yielding little or no information about lung microstructure.

The combination of the utilized diffusion time and the gradient amplitude of the system did not lead to appropriate b-values to measure diffusion weighting with SF_6 . Although this gas has been used to perform diffusion weighting MRI in small animals using larger b-values ($16 \text{ s}^2/\text{cm}$) (2), there is a general opinion that fluorinated gases with longer relaxation times such as C_2F_6 or C_3F_8 are more suitable for measurements of restricted diffusion. This will have an even higher importance in the case of human studies (5).

For the first time DW-images and ADC maps obtained from small animals using C_2F_6 have been shown. This gas permits to use longer diffusion times which in combination with the gradient strength allow larger b-values. A diffusion time of 1.5 ms allows not only to obtain diffusion weighting with a reasonable SNR but also to measure restriction in the lung. Furthermore, the resulting ADC values clearly demonstrate that this gas is constrained in a different degree in healthy and in emphysematous tissue.

The ADC maps of mono-lobular treated animals allow for direct comparison of the level of diffusion restriction between healthy and emphysematous lungs. These maps showed homogeneity of the ADC over the whole lung except in the most external areas (border of the lung) where the measurement might provide underestimated ADC values. This may be a consequence of both the projection technique - smaller thickness in the border of the lung - and differences between expiration and inspiration inflation in continuous breathing acquisition.

ADC measurements are not only sensitive to the lung microstructure but also to the concentration of C_2F_6 . As mentioned by Jacob *et al.* (4) the increase in free diffusivity produced by adding either oxygen or nitrogen to the fluorinated gas is significant. There was an increment of 20% in the free diffusion coefficient when comparing the values for pure C_2F_6 ($0.033 \text{ cm}^2/\text{s}$) with the calculated one ($0.0398 \text{ cm}^2/\text{s}$) of the mixture utilized to ventilate the animals in our study (25% of O_2 and 75% C_2F_6). The effect of different concentrations of the resonant gas versus other gases on ADC measurements was explained in detail in helium experiments performed in small animals when applying a single breath-hold (Chapters 5-7). Since fluorinated gases experiments were performed in continuous ventilation mode, the concentration of gases is maintained constant over the entire measurement time.

A couple of studies have been performed in humans with fluorinated gases. Conradi *et al.* (5) showed differences in ADC between explanted healthy donor lungs and explanted severely emphysematous lungs using both C_2F_6 and C_3F_8 . The average ADC of both groups, healthy and emphysematous lungs measured with C_2F_6 was 0.017 and $0.032 \text{ cm}^2/\text{s}$, respectively. The histogram resolved the data from both groups with relatively little overlap. Similar results were obtained by Jacob and co-workers (4), showing a significant difference between the mean ADC in healthy and in emphysematous explanted lungs. However, this is the first time that diffusion weighted images using C_2F_6 on emphysematous rats have been shown.

As it was already mentioned by Kuethe *et al.* (6) SF_6 is uniformly distributed throughout the lung and thus the signal strength is proportional to the lung volume. We expect the same to occur in the case of using C_2F_6 . In healthy animals the right lung has a larger volume ($\sim 26\%$ larger than the left lung) which yields higher signal intensity in projection images, as it was seen in both anatomical and diffusion weighted images. On the other hand, the application of elastase causes an emphysema which is associated with an increase of lung volume and hence a local signal enhancement which is in good agreement with our experimental results.

We note that some improvements could be done regarding the total acquisition time necessary to acquire the set of diffusion weighted images. However, it is important to keep in mind that when transferring this to human studies, the lung volume and therefore the signal intensity will raise which will considerably reduce the acquisition time. The ratio between lung volume and body weight is very similar for small and large mammals (7).

Considering the increasing SNR with larger lung volume it has been estimated that for a constant matrix size SNR will improve by a factor of approximately 13 when translating from rats (~ 430 g) to man (~75 kg) (8). As a rough estimation, a set of diffusion weighted images in human lungs similar to the ones shown here for rats would require a data collection time of ~ 15 s (a decrease in image acquisition of 13^2) which can be easily performed in a single breath-hold underlying the translational potential of this technique to human studies.

References

1. Rodriguez I, Perez de AR, Cortijo M, Ruiz-Cabello J. COMSPIRA: A common approach to spiral and radial MRI. Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering) 2004;20B:40-44.
2. Ruiz-Cabello J, Perez-Sanchez JM, Perez de AR, Rodriguez I, Gonzalez-Mangado N, Peces-Barba G, Cortijo M. Diffusion-weighted ^{19}F -MRI of lung periphery: Influence of pressure and air-SF₆ composition on apparent diffusion coefficients. Respir Physiol Neurobiol 2005;148(1-2):43-56.
3. Perez-Sanchez JM. La imagen de resonancia magnética de difusión de gases como herramienta de caracterización de la estructura y la función pulmonar [dissertation]. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
4. Jacob RE, Chang YV, Choong CK, Bierhals A, Zheng HD, Zheng J, Yablonskiy DA, Woods JC, Gierada DS, Conradi MS. ^{19}F MR imaging of ventilation and diffusion in excised lungs. Magn Reson Med 2005;54(3):577-585.
5. Conradi MS, Saam BT, Yablonskiy DA, Woods JC. Hyperpolarized ^3He and perfluorocarbon gas diffusion MRI of lungs. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 2006;48:63-83.
6. Kuethe DO, Behr VC, Begay S. Volume of rat lungs measured throughout the respiratory cycle using ^{19}F NMR of the inert gas SF₆. Magn Reson Med 2002;48(3):547-549.
7. Schmidt-Nielsen K. Scaling: Why is animal size so important? Cambridge Univ. Press; 1984.
8. Kuethe DO, Caprihan A, Gach HM, Lowe IJ, Fukushima E. Imaging obstructed ventilation with NMR using inert fluorinated gases. J Appl Physiol 2000;88(6):2279-2286.

Capítulo 8: Imágenes de difusión en-vivo con gases fluorados: SF₆ y C₂F₆

8.1 Metodología para la experimentación con ¹⁹F en RM

8.2 Medidas de ADC con SF₆

8.2.1. Obtención del ADC en un Phantom de SF₆

8.2.2 Obtención del ADC con SF₆ en experimentación “in vivo”

8.3 Medidas de ADC con C₂F₆

8.3.1. Obtención del ADC en un Phantom de C₂F₆

8.3.2 Obtención del ADC con C₂F₆ en experimentación “in vivo”

8.4 Discusión

Introducción

En este capítulo, la señal proveniente de gases fluorados servirá para adquirir imágenes de ventilación y de difusión. Dos gases de diferentes propiedades difusivas, SF₆ y C₂F₆, serán usados tanto en medición en phantom como en experimentación “in-vivo”. Estudios preliminares se utilizaron para establecer los valores de los parámetros de imagen con los que se obtiene una mejor relación señal-ruido y restricción en la difusión en un tiempo de adquisición adecuado para la experimentación animal. La calidad de las imágenes es se valora usando el SNR. Finalmente, la instilación mono-lobular con elastasa se aplicará en un grupo de animales para comparar los valores de ADC del tejido sano y del enfisematoso.

8.1 Metodología para la experimentación con ¹⁹F en RM

La experimentación se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Biospec de 4.7 T (Bruker, Ettlingen, Germany) con un diámetro interno de 40 cm y una frecuencia de 188 MHz para Flúor. Se usó una bobina de banda ancha de fabricación casera a modo de transmisor-receptor. El escáner tiene una máxima intensidad de gradiente de 195 mT/m en cada una de las principales direcciones, X, Y y Z, con un tiempo de 250 μs para alcanzar la amplitud máxima.

Los FIDs (free induction decay) son adquiridos usando la secuencia ComSpiRa (Combined Spiral and Radial) en su modalidad radial **(1)**. Al igual que en los experimentos con HP³He la difusión se logró aplicando gradientes bipolares de difusión (BDSG) con forma sinusoidal sin

espacio entre los dos lóbulos (**Figura 3.5**). Las radiales se adquirieron de forma no consecutiva rellenando el espacio k de todas las imágenes de difusión de forma paralela para minimizar los artefactos por movimiento (**Figura 3.7**). No se aplicó selección de corte ni en imágenes de ventilación ni de difusión.

Los valores de ADC se extrajeron del ajuste de la función exponencial a los valores de intensidad de señal obtenidos para cada pixel en las imágenes de difusión (**Eq. 3.10**).

Se obtuvieron imágenes de gases fluorados en un phantom de construcción propia hecho de un capilar de 0.28 mm diámetro interior. El phantom se llenó con SF₆ ó C₂F₆. El capilar tenía aproximadamente 20 m de longitud y contenía un volumen de unos 5 ml de gas. Se enrolló longitudinalmente alrededor de un soporte de 64 mm de longitud (**Figure 8.1**). La longitud más larga del phantom se alineó con el eje z del imán. El capilar se abrió por ambos lados para permitir que el gas fluorado fluyera hasta llenarlo, sellándolo una vez que este gas hubiera desplazado el aire del interior del capilar.

Particularmente en la experimentación con Flúor, los animales no pueden anestesiarse con isoflurano ya que este anestésico contiene átomos de Flúor que influirían en la medida. Por ello que todos los animales medidos en experimentos de ¹⁹F, se anestesiaran con pentobarbital al 6%, en proporción de 0.1 ml/100 g peso de animal. En la práctica, los animales se entubaron mediante una cánula insertada en la tráquea y se conectaron a un respirador veterinario estándar (Minerve, Francia). El volumen tidal, la frecuencia de ventilación y la relación inspiración/expiración se escogieron de acuerdo a los valores fisiológicos, es decir, 4 ml de volumen tidal, 60 respiraciones por minuto y I/E = 1/2.

Un requisito para realizar experimentos in vivo fue el de ventilar a los animales con 21 % de O₂ asegurando buenas condiciones de ventilación. Para cumplir este requisito, se mezclaron el oxígeno y el gas fluorado antes de su entrada en el ventilador. El flujo mínimo necesario fue de 240 ml/min para ventilar a 60 bpm (breaths per minute) con un volumen tidal de 4 ml. Sin embargo, para asegurar la cantidad de oxígeno necesario, incluso en el caso de posibles fluctuaciones de flujo, la concentración de oxígeno en la mezcla final fue ligeramente superior.

8.2 Medidas de ADC con SF₆

8.2.1. Obtención del ADC en un Phantom de SF₆

El Phantom (capilar) lleno con SF₆ se colocó en el centro de la bobina siguiendo la orientación mostrada en la **Figura 8.1**.

Los parámetros para las imágenes de densidad de spin fueron: FOV de 80 mm x 80 mm, tamaño de la matriz de reconstrucción 128x128 y TR=10 ms, se adquirieron 200 radiales con 128 puntos por fase y el número de promediados fue 64. Se obtuvieron imágenes en orientación coronal, axial y sagital (**Figura 8.2 a, b y c**, respectivamente). La relación señal-ruido se calculó para las imágenes obtenidas en las tres orientaciones. Las orientaciones coronal y sagital mostraron un valor similar de SNR y próximo a 8. Sin embargo, el SNR incrementó considerablemente en la orientación axial (SNR= 28). Este efecto se debe a que la cantidad de gas que contribuye a la señal es mayor en la proyección axial que en las otras dos orientaciones.

El coeficiente de auto-difusión D_{aa} de SF₆ es 0.0328 cm²/s (**2**). En el caso de un gas puro, los coeficientes de auto-difusión y de intra-difusión tienen el mismo valor, por lo tanto el coeficiente de intra-difusión D_a^* de SF₆ es también 0.0328 cm²/s. El desplazamiento de difusión libre sigue la ecuación $L = \sqrt{(2D_a^*t)}$. Para valores típicos del tiempo de difusión 1, 1.5, 2 y 3 ms, el desplazamiento calculado para la difusión libre es 81, 99, 115 y 140 μm, respectivamente.

Todas las imágenes de difusión se adquirieron en orientación axial. Se usó para el experimento de difusión un TR de 8 ms. FOV, tamaño de matriz, número de radiales, puntos por trayectoria y número de promediados fueron las mismas que para las imágenes de densidad de spin, es decir, 80x80 mm², 128x128, 200, 128 y 64. El phantom se midió usando un tiempo de difusión de 1.5 ms. Los cuatro valores de b utilizados fueron: 0.08, 3.8, 13.0 y 27.8 s/cm², el último corresponde al 95 % de intensidad de gradiente del sistema. Se aplicaron los coeficientes de difusión en las tres principales orientaciones (X, Y y Z). El SNR en la imagen obtenida con el mayor valor de b fue muy similar en las tres orientaciones de los gradientes de difusión. Los valores de ADC y el error en el ajuste a la exponencial en las tres diferentes direcciones del gradiente de difusión se muestran en la **Tabla 8.1**. Se observa un valor muy similar de ADC para los gradientes aplicados en las tres direcciones principales,

aunque el ADC medido en la dirección Z parece algo mayor. Eso se debe probablemente a que el capilar estaba orientado en la dirección Z aunque tal vez algo oblicuo.

La **Figura 8.3** muestra las cuatro imágenes de difusión adquiridas con un tiempo de difusión de 1.5 ms y el gradiente aplicado en la dirección Z. El SNR para las imágenes de difusión decrece de 7 a 4 al incrementar el valor de b de menor a mayor.

8.2.2 Obtención del ADC con SF₆ en experimentación “in vivo”

Se usaron ratas Wistar sanas (~ 400 g) para obtener imágenes anatómicas y de difusión con SF₆ utilizando la secuencia ComSpiRa. Los animales fueron ventilados con una mezcla de aproximadamente 21% O₂ y 79% SF₆, según se explicó en la **Sección 8.1**.

La **Figura 8.4** muestra la imagen anatómica típica de un animal. Los valores de los parámetros usados fueron: FOV de 80mm x 80mm, tamaño de la matriz de reconstrucción 128x128, ángulo (flip angle) de ~ 20° y TR=8 ms. El espacio k se dividió en 200 direcciones radiales con 128 puntos por trayectoria. Se adquirieron 128 acumulaciones para cada paso de fase. El SNR obtenido de las imágenes anatómicas fue de 5, con un tiempo de adquisición de aproximadamente 5 minutos.

Para el caso particular de una mezcla de gases binaria, la **Eq. 3.2** se puede simplificar en la **Eq. 8.1**. De esta ecuación se puede calcular el coeficiente de intra-difusión D_a^* de una mezcla de 79% SF₆ ($x_a=0.79$) y 21% O₂ ($x_b=0.21$), donde D_{aa} es 0.0328 cm²/s y D_{ab} es 0.0902 cm²/s **(3)**. El valor resultante para D_a^* fue 0.0375 cm²/s. El desplazamiento de difusión libre es 86, 106, 122 y 150 μm para valores de tiempo de difusión de 1, 1.5, 2 y 3 ms, respectivamente.

La **Figura 8.5** muestra las cuatro imágenes de difusión (valores de b dentro del rango de 0.02 a 8.3 s/cm²) obtenidas con un tiempo de difusión de 1 ms. El valor más alto de b se alcanzó con un 95 % de la intensidad de gradiente. Se adquirieron 64 puntos por radial y 64 radiales, con un TR de 8 ms. El tamaño de matriz de reconstrucción fue de 64 x 64 y el número de promediados de 1024 lo que requirió un tiempo total de adquisición de 35 minutos.

El corto tiempo de relajación T_1 de este gas limita los valores del tiempo de difusión que pueden ser usados. Así, T_d queda restringido a valores bajos. En nuestro caso, la combinación

de tiempos cortos de difusión y la intensidad de los gradientes del sistema conlleva bajos valores de b . La función exponencial se ajusta a la caída de la señal de intensidad de las cuatro imágenes de difusión. Si los valores de b son bajos, tal y como ocurre en nuestro experimento, la pérdida de señal es pequeña y por lo tanto ocupa la zona lineal en el ajuste exponencial. Este pequeño descenso de intensidad de señal entre el menor y el mayor valor de b hace que las medidas de ADC sean más propensas a ser afectadas por el nivel de ruido de manera considerable. Esto conlleva a una menor precisión en la obtención de los valores de ADC. Lo que sugiere que gases con T_1 y T_2 más largos sean más adecuados no solo para medir difusión, sino para observar restricción en estructuras pulmonares.

8.3 Medidas de ADC con C_2F_6

8.3.1. Obtención del ADC en un Phantom de C_2F_6

Un primer test se llevó a cabo con una botella de vidrio de 100 ml de capacidad (~ 40 mm de diámetro externo) llena de C_2F_6 puro. Los parámetros de difusión usados para la imagen de este phantom fueron: TR=8 ms, FOV de 80x80 mm², 128 radiales, 64 puntos por radial y 64 promediados. Las imágenes se adquirieron en orientación axial y los gradientes se aplicaron en la dirección Z.

Combinaciones entre diferentes tiempos de difusión e intensidades de los gradientes se usaron para realizar un test preliminar. En la **Tabla 8.2** se resume tanto los valores de b utilizados como el ADC obtenido en cada caso indicando con la palabra “lineal” el caso particular en el que los valores se ajustaran a la parte lineal de la exponencial.

El coeficiente de intradifusión libre de este gas fue medido por Jacob *et al.* (4) y resultó ser 0.033 cm²/s. Los valores de ADC resultantes de nuestro experimento concuerdan con el valor obtenido por Jacob.

El mismo phantom (botella de vidrio) se llenó con una mezcla de C_2F_6 y oxígeno, con la misma concentración que la utilizada para ventilar a los animales. El tiempo de difusión usado en este caso fue de 2 ms, el valor más alto de b fue 46.8 s/cm² y los gradientes se aplicaron en las tres orientaciones principales (X, Y y Z). Los valores de los parámetros de imagen fueron TR= 20ms, 16 promediados, 80 % de la intensidad de los gradientes, tamaño de matriz de reconstrucción 64x64, 128 radiales y 64 puntos por trayectoria. Los valores de

ADC obtenidos de las imágenes de difusión y el error en el ajuste a la exponencial para cada una de las tres orientaciones de los gradientes se muestran en la **Tabla 8.3**.

Jacob *et al.* (4) también midieron el coeficiente de intra-difusión ($D_a^* = 0.050 \text{ cm}^2/\text{s}$) de una mezcla conteniendo 50% O_2 y 50% C_2F_6 . A partir de la **Eq. 8.1** se puede calcular el coeficiente de inter-difusión. A partir del valor obtenido para el coeficiente de inter-difusión ($0.103 \text{ cm}^2/\text{s}$) se puede calcular el coeficiente de intra-difusión de cualquier mezcla de C_2F_6 y O_2 deseada. La mezcla usada en los medidas “in vivo” contienen 21 % de oxígeno, así que D_a^* resulta ser $0.0385 \text{ cm}^2/\text{s}$. Este valor es ligeramente inferior a los valores ADC obtenidos en cualquiera de las tres direcciones en que se aplicaron los gradientes de difusión. Esto podría ser debido a que la mezcla de ventilación contuviera una concentración de oxígeno mayor del 21%. En el caso particular de un 30 % de O_2 en la mezcla, el D_a sería $0.0415 \text{ cm}^2/\text{s}$, lo cual estaría de acorde a los valores mostrados en la **Tabla 8.3**. Esta Tabla muestra también valores de ADC similares en las tres direcciones de los gradientes aplicados, que a su vez fueron similares al valor de coeficiente de difusión libre. Esto indica la no restricción del gas en el interior de la botella de cristal, tal y como cabría esperar debido a su tamaño.

El phantom del capilar usado en el experimento con SF_6 fue también usado con C_2F_6 puro y colocado del mismo modo dentro del imán (**Figura 8.1**). Las imágenes se adquirieron en orientación axial a diferentes tiempos de difusión. Los parámetros más importantes fueron: $T_R = 20 \text{ ms}$, tamaño de la matriz de reconstrucción 64×64 , 64 promediados. El tiempo requerido para la adquisición de las imágenes fue de 5 minutos. Los valores de ADC obtenidos al aplicar los gradientes en las tres direcciones principales y a diferentes tiempos de difusión figuran en la **Tabla 8.4**. Como era de esperar, los valores de ADC decrecen al aumentar el tiempo de difusión en las direcciones X e Y de los gradientes. Por el contrario, los valores de ADC permanecen prácticamente constantes en la dirección Z del gradiente y con un valor similar al del coeficiente de difusión libre del C_2F_6 puro.

La longitud de difusión característica (o desplazamiento libre característico) del C_2F_6 a los tiempos de difusión estudiados se muestran en la **Tabla 8.5**.

8.3.2 Obtención del ADC con C₂F₆ en experimentación “in vivo”

Se midieron un total de 11 ratas Wistar. Cinco de ellas se usaron como animales control, mientras que las otras seis fueron inducidas en el pulmón izquierdo (LL) con 25 unidades de elastasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich) disuelta en 0.2 ml de solución salina, dejando el pulmón derecho (RL) como control interno (**Capítulo 4.2**). Todos los animales fueron medidos 8 semanas después de la inducción con elastasa. El peso medio del animal en el momento de la adquisición de la imagen fue ~ 430 g.

Los animales fueron anestesiados intra-peritonealmente con pentobarbital en una dosis de 0.06 mg/kg peso de animal. Después de la intubación, los animales se colocaron en posición supina sobre una cama animal compatible con el equipo de RM y fueron conectados a un ventilador (Minerve, Francia) que proporcionaba un volumen tidal de 4 ml con una frecuencia de respiración de 60 respiraciones por minuto. El gas de ventilación consistía en una mezcla constituida aproximadamente por un 25 % de oxígeno y 75 % de C₂F₆ (Linde Gas, Alemania). La relación tiempo de inspiración: espiración fue de 1:2.

Todas las imágenes se adquirieron en orientación coronal sin selección de corte. Las imágenes anatómicas fueron adquiridas con 128 puntos por trayectoria y 200 radiales. El tamaño de la matriz de reconstrucción fue de 128x128 y el FOV de 80 x 80 mm². Se adquirieron un total de 512 promediados requiriendo un tiempo de adquisición de 17 minutos. El TR utilizado fue 10 ms.

Los parámetros utilizados para las imágenes de difusión (DWI) fueron: 64 trayectorias radiales, 128 puntos por trayectoria, TR = 10 ms, 1024 promediados, un tiempo de difusión de 1.5 ms aplicado en dirección del corte y un ángulo de ~ 20°. El tamaño de matriz 64 x 64 con una visión de campo (FOV) de 80 x 80 mm², resultando una resolución en plano de 1.25 x 1.25 mm². Los valores de *b* utilizados fueron 0.08, 3.4, 11.7 y 25 s/cm². El tiempo requerido para adquirir las cuatro imágenes de difusión fue 44 minutos. No se aplicó sincronización en ningún caso.

Los valores de ADC se obtuvieron de diferentes regiones (ROIs) que cubrían tanto el pulmón derecho (RL) como el izquierdo (LL) de animales control y de animales inducidos con elastasa. Los ROIs se definieron manualmente y sin aplicar ningún umbral. Las

comparaciones por pares se llevaron a cabo usando la prueba t de Student pareada para comparar pulmón derecho (RL) e izquierdo (LL) del mismo grupo animal (animales control ó animales tratados con elastasa en inducción mono-lobular). La prueba t de Student no pareada se aplicó para comparar el pulmón control de animales tratados con elastasa con inducción mono-lobular con ambos pulmones de los animales control.

El valor de SNR de cada ROI se obtuvo calculando la relación entre su intensidad de señal y la intensidad de señal de base (ruido) multiplicándola por el factor $\sqrt{(\pi/2)}$ (**Capítulo 4.5**). El estudio de SNR se hizo en cada imagen de difusión tanto para el pulmón derecho como para el izquierdo de todos los animales. La prueba t de Student pareada se llevó a cabo para buscar diferencias entre RL y LL.

La **Figura 8.6** representa una típica imagen de densidad de spin de un animal control medido con C_2F_6 . El pulmón derecho (RL) aparece en el lado izquierdo de la imagen mostrando una mayor intensidad de señal que el pulmón izquierdo (LL).

La **Figura 8.7** muestra las cuatro imágenes de difusión de un animal control. La tráquea no se ve o está débilmente marcada debido a que la señal que viene de esta área es muy débil en imágenes proyectadas. Como se esperaba, la imagen obtenida con un mayor grado de difusión aparece con un mayor nivel de ruido que el resto de las imágenes. La **Figura 8.6** y la **Figura 8.7** corresponden al mismo animal. Al igual que en la imagen anatómica, en las imágenes de difusión, el pulmón derecho de los animales control aparece más brillante (mayor intensidad de señal) que el pulmón izquierdo. Este efecto fue observado en todos los animales control que se midieron ($n=5$). El SNR fue estadísticamente superior en RL que en LL para estos animales en todas las imágenes de difusión. Los valores de p obtenidos de la estadística se muestran en la **Figura 8.7**.

La **Figure 8.8** muestra la imagen anatómica típica de un animal tratado con elastasa en instilación mono-lobular. Al revés de lo que ocurría con los animales control, en los animales inducidos, el pulmón izquierdo (inducido con elastasa) aparece con una mayor intensidad de señal que el pulmón derecho.

El análisis de los seis animales tratados con inducción mono-lobular de elastasa, se llevó a cabo de la misma manera que para los animales control. Las cuatro imágenes de difusión obtenidas para los distintos valores de b de un animal inducido con elastasa, se muestran en

la **Figura 8.9**. En todas las imágenes de difusión LL presenta mayor intensidad de señal que RL. Se encontraron diferencias significativas en SNR, para todo valor de b , entre pulmón derecho y pulmón izquierdo, cuando se realizó la prueba t de Student pareada (los valores de p se muestran en la **Figura 8.9**).

El mapa de ADC correspondiente a las imágenes de difusión del animal control mostrado en la **Figura 8.7**, se presenta en la **Figura 8.10 (a)**. La **Figura 8.10 (b)** muestra el mapa de ADC del animal inducido con elastasa en el pulmón izquierdo cuyas imágenes de difusión se mostraron en la **Figura 8.9**. Los dos mapas de ADC muestran la misma escala de color. En el animal control, se observa un color similar en ambos pulmones así como homogeneidad en cada uno de ellos. El contorno del pulmón presenta un notable cambio en la intensidad de color (decrece el valor de ADC) comparado con el resto. Este efecto puede ser debido al hecho de tener imágenes proyectadas, lo que conlleva a una menor estimación de ADC en el borde. La intensidad de color mostrada por el pulmón control (RL) de un animal inducido con elastasa es similar a la obtenida en el animal control en ambos pulmones, mientras que el pulmón izquierdo (tratado con elastasa) presenta una mayor intensidad de color correspondiente a valores más altos de ADC.

Los valores individuales de ADC obtenidos de RL y LL de todos los animales control y de los inducidos con elastasa en el pulmón izquierdo se presentan en la **Figura 8.11**. La línea horizontal representa la media de ADC de todos los pulmones para cada ROI. No se encontraron diferencias significativas entre pulmón izquierdo ($ADC = 0.0193 \pm 0.0005 \text{ cm}^2/\text{s}$) y pulmón derecho ($ADC = 0.021 \pm 0.002 \text{ cm}^2/\text{s}$) de los animales control cuando se realizó la prueba t de Student pareada. Los valores de ADC del pulmón control (RL) de los animales tratados con elastasa en inducción mono-lobular se compararon con los animales control, usando la prueba t de Student no pareada, no encontrándose diferencias significativas. El valor de ADC ($ADC = 0.023 \pm 0.004 \text{ cm}^2/\text{s}$) obtenido del pulmón enfisematoso (pulmón izquierdo de animales inducidos con elastasa) fue más elevado ($p = 0.03$) que el del pulmón derecho ($ADC = 0.019 \pm 0.002 \text{ cm}^2/\text{s}$) de los mismos animales (prueba t de Student pareada). Se observa una mayor dispersión de los valores de ADC en el pulmón enfisematoso que en los pulmones control, lo que puede deberse a ligeras diferencias en el desarrollo del enfisema en cada animal.

8.4 Discusión

Una cuestión de especial interés en la experimentación con gases fluorados en IRM (especialmente en el caso de estudios preclínicos) es alcanzar suficiente intensidad de señal para obtener un adecuado valor de SNR. Existen diferentes estrategias para incrementar el SNR, algunas de ellas fueron mencionadas por Jacob y colaboradores, entre ellas destacan el campo magnético del escáner, la bobina y el número de promediados, siendo esta última una práctica muy común **(4)**. Los valores relativamente pequeños de T_1 y T_2 de estos gases permiten elevar el número de promediados sin prolongar considerablemente el tiempo total de adquisición. Por ello, gases como el SF_6 que tiene un tiempo de relajación más corto (en el orden de 2 ms) que el C_2F_6 (~ 10 ms) serían más ventajosos, permitiendo la reducción de T_R y la adquisición de un mayor número de promediados en el mismo tiempo de adquisición. Sin embargo, los cortos tiempos de relajación de estos gases limitan los tiempos de difusión a valores bajos. Por ello el uso de gases con muy corto T_1 y T_2 tiene dos principales desventajas en resonancia magnética de difusión. La primera es que los cortos tiempos de difusión deben ser combinados con gradientes de alta intensidad con el fin de conseguir valores de b adecuados. En el caso de utilizar valores de b muy altos o muy bajos las medidas de ADC serán más propensas a ser afectadas por el nivel de ruido. Esto conlleva a una menor precisión en los valores de ADC. La segunda es que los tiempos de difusión deben ser suficientemente largos para detectar restricción en las estructuras pulmonares. Si el tiempo de difusión está limitado a valores bajos, la difusión podría restringirse al rango de difusión libre, lo cual conllevaría a poca o ninguna información acerca de la microestructura pulmonar.

La combinación de los tiempos de difusión y de la intensidad de los gradientes del sistema no proporcionaron adecuados valores de b para medir difusión en el caso de SF_6 . Aunque este gas ha sido usado para medir difusión en animales pequeños utilizando mayores valores de b (16 s/cm^2) **(2)**, hay una opinión generalizada de que los gases fluorados con tiempos de relajación más largos, como C_2F_6 ó C_3F_8 , son más adecuados para medir restricción en la difusión. Esto tendría incluso una mayor importancia en el caso de estudios con humanos **(5)**.

Por primera vez, se han obtenido imágenes de difusión y mapas de ADC en animales pequeños usando C_2F_6 . Este gas permite utilizar tiempos de difusión más largos que en

combinación con los gradientes conlleven a valores de b adecuados. Un tiempo de difusión de 1.5 ms no solo permite medir difusión con un razonable SNR sino que también permite medir restricción en el pulmón. Además, los valores de ADC obtenidos demuestran claramente que este gas es restringido en diferente grado en tejido sano y en tejido enfisematoso.

Los mapas de ADC de animales inducidos en un solo pulmón permiten visualizar de forma directa la distinta restricción entre pulmón control y pulmón instilado con elastasa. Estos mapas muestran un ADC homogéneo a lo largo de todo el pulmón exceptuando el contorno del mismo en el que el ADC decrece posiblemente debido a que son imágenes proyectadas y a las diferencias entre inspiración y espiración de la medición en modo continuo.

Las medidas de ADC no son solo sensibles a la microestructura del pulmón sino también a la concentración de C_2F_6 . Como ya mencionaron Jacob *et al.* (4) existe un incremento significativo en el coeficiente de difusión libre del gas fluorado al añadirle tanto oxígeno como nitrógeno. Ya que el coeficiente de difusión libre para el C_2F_6 puro es $0.033 \text{ cm}^2/\text{s}$ y para la mezcla de ventilación utilizada en nuestro estudio (25% de O_2 y 75% de C_2F_6) es $0.0398 \text{ cm}^2/\text{s}$, este incremento ronda el 20%. El efecto de las diferentes concentraciones del gas de la especie resonante en las medidas de ADC, fue explicado en detalle en los experimentos llevados a cabo con HP^3He en ratas durante una simple apnea (capítulos 5-7). Sin embargo los experimentos con gases fluorados se llevaron a cabo con ventilación continua, así la concentración de gases se mantuvo constante durante todo el tiempo de adquisición, sin requerir una especial atención a este efecto.

Existen algunos estudios con gases fluorados en pulmones extirpados de humanos. Conradi *et al.* (5) mostraron diferencias en ADC obtenidas con C_2F_6 y C_3F_8 entre pulmones extirpados de un donante sano y de uno severamente afectado por enfisema. La media de ADC en el pulmón sano y en el enfisematoso fue 0.017 y $0.032 \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente, para el caso de C_2F_6 . El histograma diferenciaba los dos grupos con muy poco solapamiento. Jacob y colaboradores (4) obtuvieron resultados similares, mostrando diferencias significativas entre la media de ADC obtenida de pulmones extirpados sanos y enfisematosos. Sin embargo esta es la primera vez que se ha medido restricción de C_2F_6 en animales pequeños, pudiéndose comparar tejido sano y enfisematoso.

Como ya fue mencionado por Kuethe *et al.* **(6)** el SF₆ se distribuye uniformemente a través del pulmón, siendo la intensidad de señal proporcional al volumen pulmonar. Por ello, cabe esperar que ocurra lo mismo en el caso de usar C₂F₆. En animales sanos el pulmón derecho tiene mayor volumen (~ 26% más grande que el pulmón izquierdo) lo que conlleva a una mayor intensidad de señal en imágenes proyectadas. Este efecto se pudo ver tanto en las imágenes anatómicas como en las de difusión. Por el contrario, la aplicación de elastasa causa enfisema el cual está asociado a un aumento del volumen pulmonar, de ahí, el incremento de intensidad de señal observado en el pulmón enfisematoso.

Se considera que se podrían hacer algunas mejoras respecto al tiempo necesario para adquirir las imágenes de difusión. Sin embargo, es importante tener en cuenta que al transferir estos estudios de animales pequeños a humanos, el volumen pulmonar y por lo tanto la intensidad de señal aumentará, lo que permitiría reducir considerablemente el tiempo de adquisición de la imagen. La relación entre el volumen pulmonar y la masa corporal es muy similar tanto para animales pequeños como grandes **(7)**. Considerando el aumento de SNR con el volumen pulmonar y manteniendo el tamaño de la matriz constante, se estima que la SNR incrementará en un factor aproximado de 13 al extrapolar de ratas (~430 g) a humanos (~75 kg) **(8)**. Por lo tanto un conjunto de imágenes de difusión parecidas a las obtenidas con ratas se podrían adquirir en un tiempo de ~15 s en humanos (una reducción de 13² en el tiempo de adquisición). Esto podría ser realizado en una simple apnea, indicando el potencial de esta técnica para ser transferida a estudio en humanos.

Chapter 9

Summary and Conclusions

Resumen y Conclusiones

Summary and Conclusions

In this summary we list the most remarkable findings which have been the scope of this work. Moreover, we also enumerate some other important and interesting results obtained along this investigation which have been helpful to accomplish the final goals.

Hyperpolarized ^3He MRI

- Apparent diffusion coefficient (ADC) measurement during a single breath-hold implies the use of a mechanical ventilator whose variable settings can be adjusted by the user. However, this introduces other factors, e.g. lung inflation, which must be properly controlled in order to use ADC as a reliable biomarker. The greatest advantage of single breath-hold experiments, compared to continuous breathing, is the reduction in the amount of HP^3He required for the measurement.
- The good reproducibility (low intra-individual ADC variability) obtained from repetitive measurements over time suggests that neither the ventilation parameters nor the mechanical ventilation exposure time caused any damage to the animal lungs. However, ADC variability among animals was larger than the intra-subject variability indicating different physiological response from the animals to the ventilation.
- The washing cycles with HP^3He applied before the acquisition had the purpose of exchanging partially the air inside the lung to helium to improve the signal intensity. However, three wash cycles proved not to be sufficient for increasing significantly the SNR of the images, but it revealed the dependence of ADC on the number of pre-washes.
- ADC measurements performed at a fixed pressure with the standard ventilation method (ventilation with room air and imaging with pure HP-gas) are highly affected

by the level of the positive end expiratory pressure (PEEP) at which the animals are exposed. That is, ADC decreases with increasing PEEP level.

- The diffusion coefficient of a gas mixture depends on the diffusion coefficient and the concentration of the gases which compose the mixture. Thus, when using the standard method to ventilate the animals the gas composition in the lung will be different depending on the relative amount of the two gases (air and HP^3He). The larger the fraction of HP^3He , the more diffuse the mixture and the higher the ADC values. This is exactly what resulted from applying a higher number of washes and a lower level of PEEP, as long as the breath-hold pressure was fixed.
- Elastase-treated animals develop emphysema which increases not only the alveolar size but also the residual volume compared to control animals. When using the standard ventilation method at a fixed pressure, a higher residual volume (emphysema) leads to lower ADC values. On the other hand, emphysematous tissue is characterized by larger airspaces which are expected to lead to higher ADC values. Thus, ADC measurements in emphysematous animals ventilated with the standard method are affected by these two opposite contributions. This might be the explanation for the reduction and even reversion of the expected ADC differences when comparing healthy and emphysematous tissue.
- A new ventilation method VOHeM (Ventilation with Oxygen and Helium Mixture) which uses two different gas mixtures for ventilating and for MRI data acquisition with similar diffusion coefficients was proposed. The chosen gas mixtures were 21% of O_2 and 79% of ^4He for ventilation and 23% of N_2 and 77% of HP^3He for imaging. By applying this method, measurements at two different PEEP values lead to minimal differences in ADC, demonstrating the absence of any residual gas effect. This clearly identifies the problem with the gas concentration in the lung during the image acquisition. A complete control of the concentration of gases and ventilation/gas delivery protocol is important in order to use ADC as a reliable biomarker for the detection and progression of diseases, such as emphysema. An important feature of VOHeM method is its applicability to humans.

- VOHeM method was applied in healthy and whole-lung elastase-treated animals. Animals were imaged during a breath-hold at different ventilation parameters. Significant ADC differences between healthy and emphysematous lungs were obtained in measurements performed at the end of the expiration, EEV (~ 0 mbar, atmospheric pressure). However, no differences were found at the end of the inspiration, EI (~ 23 mbar above the atmospheric pressure). Thus, this method reveals differences in ADC between healthy and emphysematous tissue (at certain ventilation conditions) which were masked when using the standard ventilation method.
- For the first time, a mono-lobular elastase-instillation has been performed in small animals. The great advantage of this procedure is to reduce the number of subjects to be studied by a half while keeping the statistical power and to remove inter-subject variability. However, the results obtained from one lung might be affected by the other.
- The application of VOHeM method to mono-lobular elastase-treated animals showed similar results than the ones obtained from whole-lung induced animals. That is, significant differences between healthy and emphysematous lungs at the end of the expiration and no differences at the end of the inspiration.
- An ADC-expiration pressure curve (from 0 to ~ 22 mbar) was generated in mono-lobular elastase-treated animals. ADCs were obtained at the end of inspiration and end of expiration as well as at intermediate pressures for both lungs. This curve showed a cut-off pressure (~ 5 mbar) which divides the curve in two different regimes. ADC values from healthy and emphysematous tissue converge to a similar and constant value above the cut-off pressure. Below the cut-off pressure the ADC values are dependent on the pressure, decreasing as decreasing the pressure. In healthy lungs the ADC values decrease more rapidly with decreasing pressure than in

emphysematous lungs. Thus at the end of the expiration the ADC difference is maximal.

- ADC measurements performed in four mono-lobular induced animals at 4 and 6 weeks after elastase challenge did not show significant differences indicating a similar degree of emphysema development.
- The efficacy of mono-lobular rat lung instillation procedure was finally confirmed by histology, showing the expected differences in lung microstructure between healthy and emphysematous tissue in the same animal. A very homogeneous and rounded structure was seen in the control lung whereas the emphysematous showed a clear expansion of the airspaces due to the destruction of a part of the tissue caused by the elastase.

Fluorinated gases MRI

- The short T_1 and T_2 of SF_6 allow for rapid signal averaging to increase the SNR. However, these short relaxation times restrict the diffusion times to low values. The combination of diffusion time and the gradient strength of the system must lead to adequate b-values which permit measuring not only diffusion but also restriction. This was not the case of SF_6 in our experimental setup, suggesting that fluorinated gases with longer T_1 and T_2 might be more convenient for diffusion measurements. This is even a bigger concern in human studies.
- For the first time diffusion weighted images using C_2F_6 and the corresponding ADC maps in small animals have been acquired. The resulting ADC values clearly demonstrate that the microstructure of the lung restricts the diffusion of C_2F_6 when using 1.5 ms of diffusion time. Mono-lobular elastase-treated animals were used in diffusion weighting imaging. The different degree of gas restriction between treated

and non-treated lung permit to distinguish healthy from emphysematous tissue. This can be directly visualized from the ADC maps.

- Some future improvements could be done regarding the total acquisition time necessary to acquire the set of diffusion weighted images. However, it is important to keep in mind that when transferring this to human studies, the lung volume and therefore the signal intensity will raise. We estimated that images with similar SNR values could be acquired in humans in a useful range of time (single breath-hold).

Capítulo 9: Resumen y Conclusiones

En este resumen se exponen los resultados más importantes que han formado parte de los objetivos principales de este trabajo de investigación. Además, se presentan otros aspectos que han servido de ayuda en el desarrollo experimental para alcanzar los objetivos de esta tesis doctoral.

Resonancia Magnética con ^3He hiperpolarizado

- Las medidas de ADC durante una simple apnea implican el uso de un ventilador mecánico cuyos parámetros pueden ser escogidos y modificados por el usuario. Sin embargo, existen ciertos factores como la inflación del pulmón que deben ser propiamente controlados, con objeto de utilizar el ADC como un biomarcador fiable. La mayor ventaja de los experimentos obtenidos en una sola apnea, comparados con los de ventilación continua, es la reducción del consumo de gas hiperpolarizado, con la consecuente reducción en costes.
- La pequeña variabilidad del ADC para cada individuo (<2%) indicó una buena reproducibilidad, sugiriendo que ni las condiciones de ventilación ni el tiempo de exposición de los animales al sistema de ventilación causaron daño al pulmón. La variabilidad entre sujetos resultó ser mayor que la de intra-sujetos incluso entre aquellos animales medidos bajo las mismas condiciones de ventilación.
- La maniobra de pre-lavar con HP^3He antes de la aplicación de la apnea tuvo el objetivo de intercambiar el aire dentro del pulmón por helio para incrementar la intensidad de señal de las imágenes. Sin embargo, los tres pre-lavados no fueron suficientes para mejorar de forma significativa el SNR pero se reveló la dependencia del ADC con el número de pre-lavados.

- Medidas de ADC realizadas a una presión fija usando el método de ventilación estándar (ventilación con aire e imagen con HP^3He) varían de manera considerable al aplicar una presión positiva (PEEP) durante la ventilación a los animales. Es decir, el ADC decrece al aumentar el nivel de PEEP.
- El coeficiente de difusión de una mezcla gaseosa depende del coeficiente de difusión y de la concentración de los gases que componen la mezcla. Así, al ventilar a los animales con el método estándar, la composición de gas en el pulmón en el momento de la adquisición dependerá de la cantidad relativa de los gases. Una mayor fracción de HP^3He conlleva una mayor difusividad de la mezcla y por lo tanto valores más elevados de ADC. Esto se puso de manifiesto tanto al aumentar el número de pre-lavados como al disminuir el nivel del PEEP, siempre y cuando se adquiriera la imagen durante una apnea a presión fija.
- Los animales inducidos con elastasa desarrollan enfisema. Esto conlleva tanto a un aumento del tamaño alveolar como del volumen del gas residual comparado con animales sanos. Cuando se aplica el método estándar de ventilación, un mayor volumen de gas residual (enfisema) conlleva una disminución de los valores de ADC. Por otro lado, el tejido enfisematoso está caracterizado por mayores espacios alveolares y por tanto cabe esperar mayores valores de ADC. Así que las medidas de ADC en animales enfisematosos ventilados con el método estándar se verán afectadas por estos dos factores, que son opuestos y que pueden reducir las diferencias de ADC esperadas al comparar tejidos sanos y enfisematosos.
- Se ha propuesto un método de ventilación que usa dos mezclas de gases diferentes, una para la ventilación y otra para la adquisición de las imágenes. Este nuevo método que denominamos VOHeM (Ventilation with Oxygen and Helium Mixture) tiene como objetivo minimizar la dependencia del volumen del gas residual sobre el ADC. La mezcla de ventilación consistía en 21% de O_2 y 79% de ^4He y la mezcla para la adquisición de imágenes contenía 23% de N_2 y 77% de HP^3He . Así, con la aplicación de este método, las medidas de ADC se reducían al mínimo para distintos valores de PEEP. Esto identifica claramente el problema con la concentración de gases en el

pulmón en el momento de la adquisición. El control de la concentración de gases, la ventilación y la aplicación de un bolo de gas hiperpolarizado es importante para usar el ADC como un biomarcador fiable en la detección de enfermedades, tal como enfisema. Una característica importante de este método es su fácil aplicabilidad a humanos.

- El método VOHeM fue aplicado en animales sanos y en animales inducidos con elastasa en pulmón completo. Estos animales se midieron durante una apnea a diferentes parámetros de ventilación. Se encontraron diferencias significativas entre animales sanos y enfisematosos en medidas realizadas al final de la espiración, EEV (~ 0 mbar, presión atmosférica). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se obtuvieron las imágenes al final de la inspiración, EI (~ 23 mbar sobre la presión atmosférica). Este método de ventilación mostró diferencias entre tejido sano y enfisematoso (a ciertas condiciones de ventilación) que no fueron observadas con el método estándar.
- La inducción mono-lobular de elastasa en animales pequeños ha sido realizada por primera vez en este trabajo. Las mayores ventajas de este procedimiento son: reducir a la mitad el número de sujetos a estudiar manteniendo la estadística y eliminar la variabilidad entre individuos. Sin embargo los resultados obtenidos para un pulmón se podrían ver afectados por el estado del otro pulmón.
- El método VOHeM también fue aplicado a animales con inducción mono-lobular. Los resultados obtenidos de estos animales mostraron un comportamiento similar al de los animales inducidos en ambos pulmones. Es decir, se observaron diferencias significativas entre pulmones sanos y enfisematosos al final de la espiración pero no al final de la inspiración.
- La obtención de la curva de ADC-presión de espiración en animales con inducción mono-lobular permitió no solo obtener el ADC en los valores extremos de presión (al final de la espiración y de la inspiración), sino también, en los valores a presiones intermedias (desde 0 a ~ 23 mbar). La curva muestra dos diferentes regiones cuyo borde es la presión de corte de aproximadamente 5 mbar. Los valores de ADC de los

tejidos sanos y enfisematosos convergen a un valor similar y constante para presiones mayores a ~ 5 milibares. A presiones por debajo de la de corte, los valores de ADC se vuelven dependientes de la presión, decreciendo al disminuir ésta. En pulmones sanos, los valores de ADC disminuyen más rápidamente con la presión que en pulmones enfisematosos. Así, al final de la espiración la diferencia de ADC se hace máxima.

- Las medidas de ADC en ratas realizadas 4 y 6 semanas después de la inducción con elastasa en un solo pulmón no mostraron diferencias significativas.
- Las imágenes histológicas se pueden considerar como una prueba final del éxito de la inducción mono-lobular en ratas, quedando patente las diferencias en la microestructura pulmonar entre tejidos sanos y tejidos enfisematosos, para el mismo animal. En estas imágenes se observa una estructura homogénea y redondeada en el caso de animales sanos, mientras que la expansión alveolar (destrucción de las paredes alveolares) producida por la elastasa queda patente en los animales enfisematosos.

Resonancia Magnética con gases fluorados

- El uso de tiempos de relajación T_1 y T_2 cortos permiten un mayor número de promediados para incrementar el SNR. Sin embargo, estos cortos tiempos de relajación limitan los tiempos de difusión a valores también cortos. La combinación de tiempos de difusión y de la intensidad de los gradientes del sistema debe conllevar a valores de b adecuados que permitan no solo la medida de difusión sino también el observar restricción. Este no es el caso de SF_6 en nuestro dispositivo experimental, sugiriendo que gases fluorados con tiempos T_1 y T_2 más largos serían más convenientes para medidas de difusión. Esto tendría incluso mayor importancia en el caso de estudios en humanos.

- Por primera vez se han mostrado imágenes de difusión con C_2F_6 y mapas de ADC en animales pequeños. Los valores de ADC resultantes demuestran claramente que la microestructura del pulmón restringe la difusión de C_2F_6 cuando se usa un tiempo de difusión de 1.5 ms. Para los experimentos con este gas, se utilizaron animales inducidos con elastasa en un solo pulmón. El diferente nivel de restricción entre pulmones control e inducidos permite distinguir entre tejido sano y tejido enfisematoso. Esto puede ser directamente visualizado en los mapas de ADC.
- En el futuro, el tiempo total de adquisición de las imágenes de difusión se podría reducir. Aunque es importante tener en cuenta que al transferir estos resultados a humanos, el volumen pulmonar y por tanto la intensidad de la señal aumentarían. Así, se estima que imágenes con valores similares de SNR se podrían adquirir en humanos en una simple apnea.

Appendix

Software of the ventilation system

Software of the ventilation system

An MR-compatible time-controlled animal ventilator-applicator was used for all helium experiments (1). This ventilator was designed for delivery of both normal breathing gases at a tidal volume for ventilation and hyperpolarized gases for image acquisition. The ventilator works in three different modes: ventilation, acquisition and manual.

Ventilation mode is used to ventilate animals at normal tidal volumes. Both conventional room air and special gas mixtures can be used for ventilation as long as an oxygen content of 21% is provided.

In the acquisition mode, the ventilator works as an applicator to deliver a bolus of HP-gas to the animal. Two independent sets of parameters define two different series of ventilation cycles. The first series of cycles serves as pre-washes to clear the lung from ventilation gas while the second series consists of a single breath-hold for acquisition. The number of cycles and the cycle maximum pressure are set independently for each series.

All pneumatic valves can be controlled manually by the software (manual mode). This mode is used prior to any experiment for cleaning the ventilation system from oxygen contamination and for checking for leakages. The circuit is filled with nitrogen in order to remove any residual oxygen. This nitrogen is eliminated from the circuit by evacuating. At this point the pressure in the circuit is checked ensuring no leakages. When the circuit is totally sealed and without oxygen the glass cell with HP-gas can be connected.

The ventilator was computer-controlled using software developed on LabVIEW (International Instruments, Austin, TX). The ventilation parameters, such as breathing rate and duration of inspiration/expiration, can be controlled from the LabVIEW application. The tidal volume is set by a combination of the inspiration time and by adjusting the gas flow in the ventilation mode (2). The ventilator generates an output trigger that is used to synchronize the image acquisition.

Figure A.1 shows the front panel of the LabVIEW application with the ventilation mode window. The intra-tracheal pressure of the animals is monitored in real time and visualized in the main display. There are three different counters which provide the information

regarding the number of normal breathing cycles, pre-washes and breath-holds applied to the animal. In this window, six different parameters can be set manually defining the complete scheme of normal ventilation. The maximum inspiration pressure reached in a cycle is determined by the lapse of time between the beginning and the end of the inspiration period and the flow of the gas. The duration of the cycles (1 s for normal breathing cycles) determines the respiratory rate.

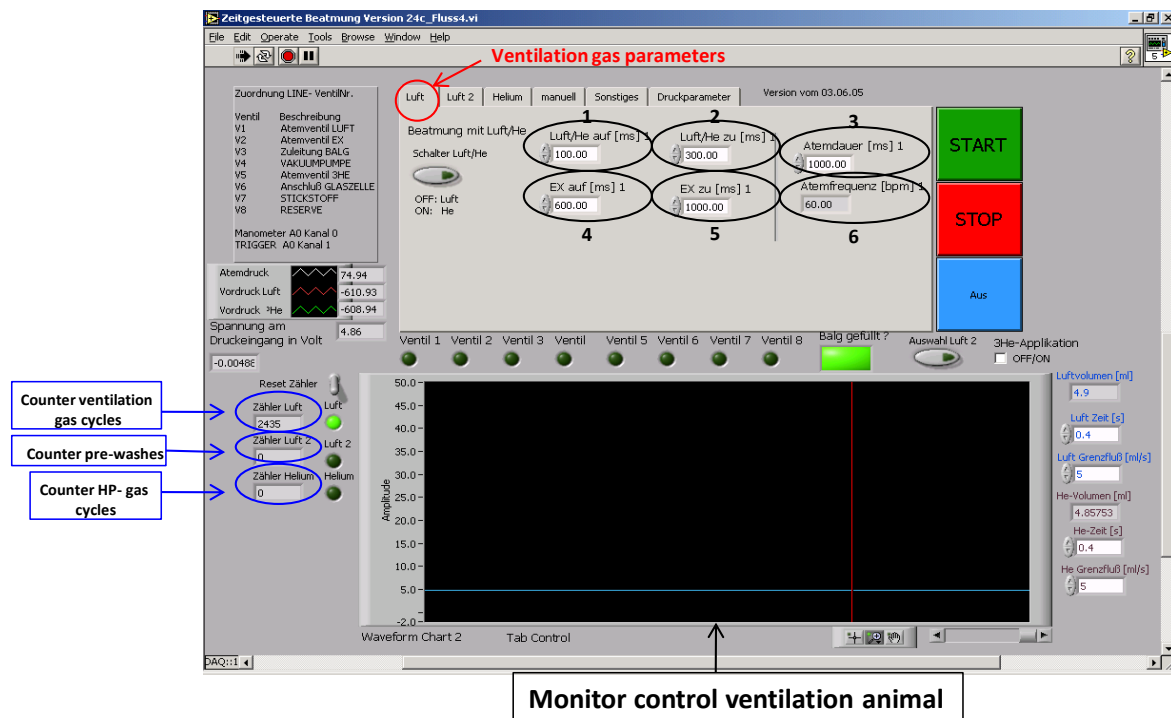


Figure A.1

Front panel of LabVIEW and ventilation mode window. The option of the mode window is shown in red (parameters for ventilation mode). The pressure is real-time controlled and displayed in the monitor window. Ventilation parameters are set in 1-6 and in blue are marked the counters for the cycles. 1 and 2 represent the starting and end point for the inspiration period whereas 4 and 5 are the respective time points for the expiration. 3 sets the duration of each cycle and 6 is the number of breaths per minute (bpm). All times are measured in ms.

In the acquisition mode window, the parameters to define the breath-hold with HP-gas can be set (Figure A.2). The most important differences in comparison with the ventilation cycles

are the duration of the cycle (12s for the breath-hold) and the pressure reached at the end of the inspiration (EI pressure). In this window the trigger can be activated at the precise time point when it has to be sent from the ventilator to the MR scanner. The parameters which define the pre-washes (performed with HP-gas) are set in a similar dialog window (not shown).

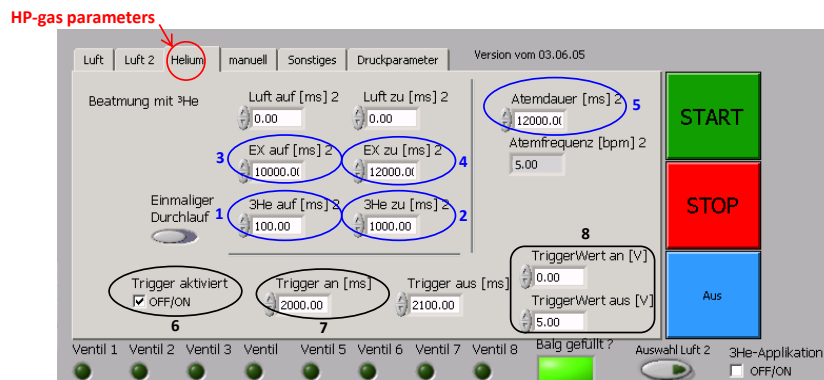


Figure A.2

Acquisition mode window sets the parameters for the application of a breath-hold with HP-gas. 1 and 2 indicates the starting and the end point of the inspiration period, and 3 and 4 of expiration period. 5 shows the duration of the cycle (breath-hold). 6 indicates the state of the trigger (ON/OFF) and 7 controls the time point when the trigger is sent from the ventilator to the MR scanner. 8 indicates the voltage applied to trigger. All the values shown are the ones used for applying a breath-hold at full-inspiration (EI BH). The values in 3 and 7 must be changed in order to perform a breath-hold at the end of the expiration.

A series of LED-like displays indicates whenever a valve is opened. In the manual control window, all valves can be opened by the user (**Figure A.3**). This window controls the filling of the bag with HP³He from the glass cell as well as application of the bolus of HP-gas to the animal. This mode is also used for testing and cleaning the system. When pressing the button “fill bag” the bag is automatically evacuated to remove all residual gas and immediately afterwards it is filled with fresh HP-gas from the glass cell. A laser photoelectric relay is used to control and stop the filling of the bag. Once the bag is filled the corresponding LED switches on and the user can apply the required combination of pre-

washes and breath-hold. When the breath-hold is finished the ventilation is automatically switched back to normal ventilation mode.

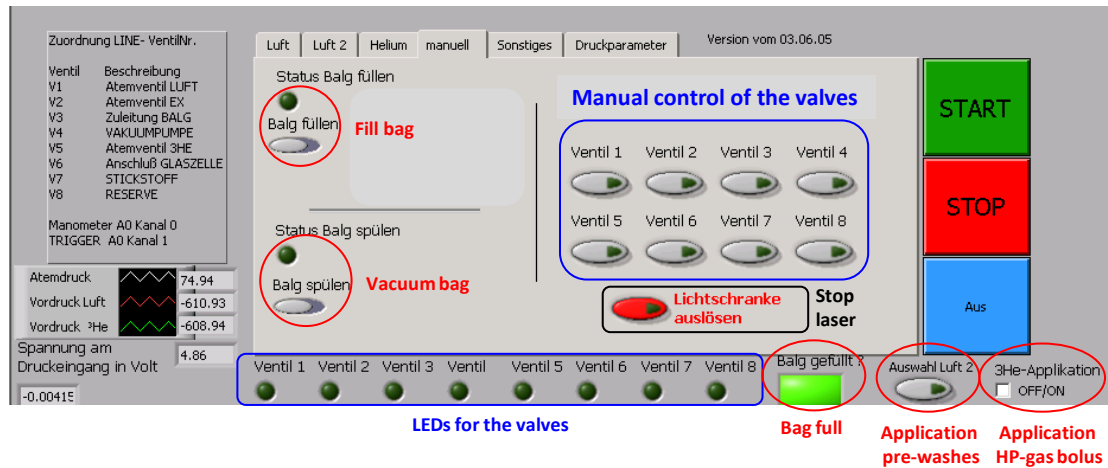


Figure A.3

Manual mode window. LEDs indicate the state (open/close) of the valves. In this mode the bag can be filled and the pre-washes (if they are required) and breath-hold can be applied.

References

1. Rudersdorf D. Entwicklung und Anwendung eines Beatmungssystems zur Untersuchung der Lungenfeinstruktur mittels He-3-Magnetresonanztomographie [dissertation]. Institut für Physik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2010.
2. Hedlund LW, Cofer GP, Owen SJ, Ian Johnson G. MR-compatible ventilator for small animals: computer-controlled ventilation for proton and noble gas imaging. *Magnetic Resonance Imaging* 2000; **18**: 753-759.

List of Figures

2.1 *Anatomy of the rat lung*

2.2 *Scheme of a pulmonary tree*

2.3 *Pictorial representation of lung volumes and lung capacities*

2.4 *Representation of the respiratory bronchiole, alveolar ducts and alveoli: A) normal acinus, B) centriacinar emphysema and C) panacinar emphysema*

2.5 *Comparative scheme of the most important lung volumes in healthy and emphysematous lungs*

3.1 *Effect of laser-polarization of an ensemble of spin-1/2 nuclei in comparison with the Boltzmann distribution. a) Thermal equilibrium. b) Optical pumping*

3.2 *Comparison of a freely and spherically restricted diffusion of a particle measured at different time regimes*

3.3 *Comparison of the movement restriction in different structures sizes where the gas is confined*

3.4 *Particle diffusing inside a cylinder*

3.5 *Pulse sequence scheme showing the sinusoidal BDSG*

3.6 *Scheme of a sequential (a) and a non-sequential (b) acquisition order of radial trajectories in an image*

3.7 *Scheme of the non-sequential acquisition order of a set of four DW images obtained with radial trajectories*

4.1 *Experimental setup of the ventilation system. Disposición experimental del sistema de ventilación*

4.2 Shielded box which is used to store the HP^3He glass cell. *Caja de aislamiento en la que se almacena la célula de HP^3He*

4.3 Illustration of the HP^3He Tedlar bag and the 4He box (Plexiglas). *Ilustración de la bolsa de HP^3He y la caja de Plexiglas para 4He*

4.4 Real-time ventilation scheme of a representative animal (breath-hold at EEV). *Esquema de ventilación a tiempo real de un animal (apnea a EEV)*

4.5 Real-time ventilation scheme of a representative animal (end-inspiration breath-hold). *Esquema de ventilación a tiempo real de un animal (la apnea al final de la inspiración)*

4.6 Ventilation at tidal volume of a representative animal showing the effect of applying a PEEP. *Ventilación a volumen tidal de un animal típico mostrando el efecto de la aplicación de un PEEP.*

4.7 Representative anatomical image performed with HP^3He . *Imagen anatómica típica obtenida con HP^3He .*

4.8 Set of diffusion weighted images performed with HP^3He . *Imágenes de difusión obtenidas con HP^3He .*

4.9 Definition of the regions of interest (ROIs). *Definición de las regiones de interés (ROIs)*

4.10 Representative ADC map. *Mapa representativo de ADC*

5.1 SNR values obtained from lowest and highest b-value images at different delays. *Valores de SNR obtenidos a partir de las imágenes de menor y mayor valor de b.*

5.2 ADC dependence on number of pre-washes. *Dependencia de ADC con el número de prelavados*

5.3 Theoretical calculation for the diffusion coefficient of 3He related to the number of prewashes with 3He . *Cálculo teórico del coeficiente de difusión de 3He en relación al número de prelavados con 3He*

5.4 ADC-PEEP curve for three animals (EI BH ~ 13 mbar). *Curva ADC-PEEP obtenida en tres animales (EI BH ~ 13 mbares).*

5.5 Images of an animal acquired at EI BH of 13 mbar at three different PEEP values (PEEP0, PEEP8 and PEEP12). *Imágenes de un animal adquiridas a un EI BH de 13 mbares a tres valores diferentes de PEEP (PEEP0, PEEP8 y PEEP12).*

5.6 SNR-PEEP curve for three animals ventilated with air and imaged with pure HP^3He . *Curva de SNR frente a PEEP para tres animales ventilados con aire y medidos con HP^3He puro*

5.7 Mean ADC values and standard deviation of four animal groups classified depending on the ventilation conditions at five different time points of ventilation. *Valores medios de ADC y la desviación estándar para cuatro grupos de animales clasificados dependiendo de las condiciones de ventilación a cinco tiempos de ventilación diferentes*

5.8 Individual ADC values at five different time points of ventilation for the three animals belonging to the group “22mbar-PEEP0”. *Valores individuales de ADC tomados a cinco tiempos de ventilación diferentes para los tres animales del grupo “22mbares-PEEP0”*

5.9 ADC maps of a representative animal measured under the four ventilation conditions. *Mapas de ADC de un animal medido a cuatro condiciones de ventilación*

5.10 Mean lung area and the standard deviation of three animals measured at different ventilation conditions. *Área pulmonar media y desviación estándar de tres animales medidos a diferentes condiciones de ventilación*

5.11 ADC data obtained from control and whole-lung elastase-treated animals measured at four ventilation conditions. *Datos de ADC obtenidos a cuatro condiciones de ventilación en animales control y animales inducidos con elastasa en pulmón completo*

6.1 Scheme of lung volumes and/or pressures when imaging at a fixed EI BH pressure and at three different PEEP levels. *Esquema de volúmenes y/o presiones del pulmón cuando se adquiere la imagen a una presión fija de EI BH para tres valores de PEEP diferentes*

6.2 Scheme of lung volumes and/or pressures when imaging at a fixed incoming volume and at three different PEEP levels. *Esquema de volúmenes y /o presiones del pulmón cuando se adquiere la imagen a un volumen fijo aplicado para tres valores de PEEP diferentes*

6.3 Scheme of gas mixture composition and gases concentrations at three different PEEP levels in the standard ventilation method (fixed EI BH). *Esquema de la composición de la mezcla de gas y la concentración de gases a tres valores de PEEP diferentes en el método de ventilación estándar (EI BH fija)*

6.4 Scheme of gas mixture composition and gases concentrations at three different PEEP levels and at fixed EI BH in the proposed ventilation method. *Esquema de la composición de*

la mezcla de gas y la concentración de gases a tres valores de PEEP diferentes y a EI BH fija en el método de ventilación propuesto

6.5 Mean ADC and standard deviation at two different PEEP levels for the standard and VOHeM method. *Media de ADC y desviación estándar a dos valores de PEEP diferentes para el método de ventilación estándar y el método VOHeM*

6.6 Relative ADC differences (%) between PEEP0 and PEEP5 normalized to the ADC value obtained at PEEP0 for two healthy animals (C1 and C2) measured under the two ventilation methods. *Diferencias relativas de ADC (%) entre PEEP0 y PEEP5 normalizadas al valor de ADC obtenido a PEEP0 para dos animales sanos (C1 y C2), medidos usando los dos métodos de ventilación*

7.1 Sectioning regions of the lung for histological studies. *Regiones en el que el pulmón se dividió para los estudios de histología*

7.2 ADC comparison between left and right lung at four different ventilation conditions in healthy and whole-lung elastase-treated animals. *Comparación de los valores de ADC obtenidos del pulmón derecho e izquierdo a cuatro condiciones de ventilación diferentes tanto para animales sanos como para animales inducidos con elastasa a pulmón completo*

7.3 Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous animals (whole-lung instilled) at the end of the expiration (atmospheric pressure, EEV). *Media y desviación estándar del ADC en animales sanos y enfisematosos (inducidos en pulmón completo) medidos al final de la espiración (EEV, presión atmosférica)*

7.4 Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous animals (whole-lung instilled) at the end of the inspiration (~23 mbar above the atmospheric pressure, EI BH). *Media y desviación estándar del ADC en animales sanos y enfisematosos (inducidos en pulmón completo) medidos al final de la inspiración (EI BH, ~23 mbar sobre la presión atmosférica)*

7.5 Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous lungs (mono-lobular instillation) at the end of the expiration (atmospheric pressure, EEV). *Media y desviación estándar del ADC en pulmones sanos y enfisematosos (inducción mono-lobular) medidos al final de la espiración (EEV, presión atmosférica)*

7.6 Mean ADC values and standard deviation of healthy and emphysematous lungs (mono-lobular instillation) at the end of the inspiration (~23 mbar above the atmospheric pressure, EI BH). *Media y desviación estándar del ADC en pulmones sanos y enfisematosos (inducción mono-lobular) medidos al final de la inspiración (EI BH, ~23 mbar sobre la presión atmosférica)*

7.7 ADC values obtained from the healthy and emphysematous lungs at several expiration pressures ranging from EEV to EI BH of a representative mono-lobular elastase-instilled animal. *Valores de ADC obtenidos del pulmón sano y del enfisematoso a varios valores de presión de espiración (desde EEV hasta EI BH) para un animal tratado con inducción mono-lobular*

7.8 ADC map of a representative mono-lobular instilled animal (EEV). *Mapa representativo de ADC de un animal tratado con inducción mono-lobular (EEV)*

7.9 H&E stained images from region A and D of a representative mono-lobular instilled animal. *Imágenes histológicas (teñido H&E) obtenidas en la región A y D de un mismo animal tratado con inducción mono-lobular*

7.10 A histological image from region A (healthy lung) of a mono-lobular instilled animal showing the analysis of three different parameters: linear intercept, area of the airspaces and equivalent radius. *Imagen histológica de la región A (pulmón sano) de un animal tratado con inducción mono-lobular, mostrando el análisis de tres parámetros diferentes de histología: intersección lineal, área de los espacios alveolares y radio equivalente*

7.11 A histological image from region D (elastase-treated lung) of a mono-lobular instilled animal showing the analysis of three different parameters: linear intercept, area of the airspaces and equivalent radius. *Imagen histológica de la región D (pulmón enfisematoso) de un animal tratado con inducción mono-lobular, mostrando el análisis de tres parámetros diferentes de histología: intersección lineal, área de los espacios alveolares y radio equivalente*

8.1 Dimensions of fluorinated gases capillary phantom and coordinate axis of the scanner. *Dimensiones del capilar usado como phantom en experimentos de gases fluorados. Eje de coordenadas del escáner*

8.2 Anatomical images of SF₆ phantom in coronal (a), axial (b) and sagittal (c) orientation.

Imágenes anatómicas del phantom de SF₆ en orientación coronal (a), axial (b) y sagital (c)

8.3 Set of four axial diffusion images acquired at 1.5 ms of diffusion time in Z direction for the

SF₆ phantom (64 averages). *Imágenes de difusión en proyección axial adquiridas con un tiempo de difusión de 1.5 ms en dirección Z para el phantom de SF₆ (64 promediados)*

8.4 Anatomical image of a rat acquired with SF₆. *Imagen anatómica de una rata adquirida con SF₆*

8.5 Set of diffusion images of a healthy rat acquired with SF₆ using a diffusion time of 1 ms.

Imágenes de difusión para un animal sano adquiridas con SF₆ a un tiempo de difusión de 1 ms

8.6 Spin density image of a representative control animal acquired with C₂F₆. *Imagen anatómica para un animal control adquirida con C₂F₆*

8.7 Diffusion weighted images acquired with C₂F₆ of a representative control animal.

Imágenes de difusión adquiridas con C₂F₆ para un animal control típico

8.8 Anatomical image of a representative mono-lobular elastase-treated animal acquired

with C₂F₆. *Típica imagen anatómica para un animal tratado con instilación mono-lobular adquirida con C₂F₆*

8.9 Diffusion weighted images acquired with C₂F₆ of a representative animal induced with

elastase in the left lung. *Imágenes de difusión con C₂F₆ para un típico animal tratado con instilación mono-lobular*

8.10 ADC maps obtained with C₂F₆ of representative control (a) and mono-lobular elastase-

treated (b) animals. *Mapas de ADC obtenidos de C₂F₆ para un animal control (a) y para uno tratado con elastasa en un solo pulmón (b)*

8.11 Individual ADC values obtained from both lungs (RL and LL) of control and mono-lobular

elastase-treated animals. *Valores individuales de ADC obtenidos del pulmón derecho e izquierdo (RL y LL) tanto de los animales control como de los tratados con elastasa en inducción mono-lobular*

A.1 Front panel of LabVIEW and ventilation mode window

A.2 Acquisition mode window of LabVIEW

A.3 Manual mode window of LabVIEW

List of Tables

2.1 Typical lung parameters for a representative 300 g rat

2.2 GOLD criteria for COPD diagnosis

3.1 Physical and chemical properties of ^3He and ^{129}Xe

3.2 Measured T_1 and T_2 relaxation time constants in lung

3.3 Summary of some important parameters for MRI of SF_6 and C_2F_6

5.1 Percent error in mean ADC for specific SNR values. *Error porcentual en la media de ADC para un valor específico de SNR*

5.2 Pair-wise comparisons performed with Student's t-test (paired or unpaired) showing the p value and the significance level. *Comparación por pares obtenida con la prueba t de Student (pareada o no-pareada) mostrando el nivel de significancia y el valor p.*

6.1 Calculation of diffusion coefficient for Mixture 1 and for different gases concentrations for Mixture 2. *Cálculo de los coeficientes de difusión para la Mezcla 1 y para diferentes concentraciones de gases para la Mezcla 2*

6.2 Summary of the pair-wise comparisons (ADC mean differences and p value) between animal groups measured at different levels of PEEP in standard and VOHeM method. *Resumen de los resultados estadísticos (diferencia de las medias de ADC y valor de p) de los grupos animales medidos a distintos valores de PEEP, tanto con el método estándar como con el método VOHeM*

8.1 ADC values and fitting error of the capillary phantom for X, Y and Z orientation of the diffusion gradients. *Valores de ADC y el error en el ajuste a la exponencial cuando los gradientes de difusión son aplicados en X, Y y Z*

8.2 Summary of the parameters used for testing a glass bottle containing ~ 100 ml of C_2F_6 . *Resumen de los parámetros utilizados en pruebas con un frasco de ~ 100 ml de C_2F_6*

8.3 ADC values and fitting error of the glass bottle phantom containing approximately 21%O₂ and 79% C₂F₆ for X, Y and Z orientation of the diffusion gradients. *Valores de ADC y el error en el ajuste a la exponencial de un frasco con aproximadamente 21%O₂ y 79% C₂F₆ cuando los gradientes de difusión son aplicados en X, Y y Z*

8.4 ADC values (fitting error) obtained from pure C₂F₆ capillary phantom at different diffusion times in the three main diffusion gradients orientations (X, Y and Z). *Valores de ADC (error en el ajuste) obtenidos del capilar llenado con C₂F₆ puro a diferentes tiempos de difusión para gradientes de difusión aplicados en las tres orientaciones principales (X, Y y Z).*

8.5 Characteristic free displacement of pure C₂F₆ at different T_d ($D_a^* = 0.033 \text{ cm}^2/\text{s}$). *Desplazamiento libre característico para C₂F₆ puro a distintos tiempos de difusión ($D_a^* = 0.033 \text{ cm}^2/\text{s}$)*

List of Abbreviations

ADC	Apparent Diffusion Coefficient
AIA	Alveolar Internal Area
BDSG	Bipolar Diffusion Sensitizing Gradient
BH	Breath-hold
bpm	breaths per minute
ComSpiRa	COMined SPIral Radial
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CT	Computed Tomography
D	Diffusion Coefficient
DI	Destructive Index
DWI	Diffusion Weighted Imaging
EEP	End Expiratory Pressure
EEV	End Expiratory Volume
EI	End Inspiration
EI BH	End Inspiratory Breath-hold
ERV	Expiratory Reserve Volume
FEV1	Forced Expiratory Volume (1 second)
FID	Free Induction Decay
FLC	Functional Lung Capacity
FoV	Field of View
FRC	Functional Residual Capacity
FVC	Forced Vital Capacity
HP-gas	Hyperpolarized Gas
i.p.	intra-peritoneal
IC	Inspiratory Capacity
IRV	Inspiratory Reserve Volume
LL	Left Lung
Lm	Mean Linear Intercept
MEOP	Metastability Exchange Optical Pumping
MRI	Magnetic Resonance Imaging
OP	Optical Pumping
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
PFTs	Pulmonary Function Test's
PIP	Peak Inspiratory Pressure

RL	Right Lung
ROI	Region of Interest
RV	Residual Volume
SAR	Specific Absorption Rate
SEOP	Spin Exchange Optical Pumping
SI	Signal Intensity
SNR	Signal to Noise Ratio
Td	Diffusion Time
TGV	Thoracic Gas Volume
TLC	Total Lung Capacity
TR	Repetition Time
TV	Tidal Volume
VC	Vital Capacity
VILI	Ventilator Induced Lung Injury
VOHeM	Ventilation with Oxygen and Helium Mixture